



**Marta Isabel Esteves
Pinheiro**

**As nanoesferas de carragenana como potencial
veículo de fármacos**



**Marta Isabel Esteves
Pinheiro**

**As nanoesferas de carragenana como potencial
veículo de fármacos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica realizada sob a orientação científica do Doutor Miguel Oliveira Bolseiro de Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, Doutora Helena Oliveira Bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e Professora Doutora Conceição Santos Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri
presidente

Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Brian James Goodfellow
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

José Miguel Pimenta Ferreira de Oliveira
Bolseiro de Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Helena Cristina Correia de Oliveira
Bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos
Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço ao Doutor Miguel Oliveira, Doutora Helena Oliveira e à Professora Doutora Maria da Conceição Santos pela orientação deste trabalho. Estou grata pela confiança que depositaram em mim, pela disponibilidade e pelo que me ensinaram, que contribuiu para a realização deste trabalho. Agradeço também à Doutora Ana Luísa Silva pela disponibilidade e apoio.

Agradeço ao Laboratório de Biotecnologia e Citómica do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro que me proporcionou todas as condições para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório que sempre me ajudaram quando necessitei e por todo o apoio.

Agradeço aos meus amigos, em especial ao Paulo, Susana e Mariana pelo apoio incondicional, paciência e conforto que me proporcionaram ao longo deste ano.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe pelo apoio incondicional, incentivo desde sempre.

Obrigada a todos.

palavras-chave

Transporte de fármacos, nanogel, carragenana, queratinócitos, toxicidade.

resumo

O transporte de fármacos através da pele é vantajoso, uma vez que não causa efeitos adversos a nível gastrointestinal e permite a sua libertação controlada. A utilização de novos biomateriais com propriedades de interesse tecnológico requer uma análise da sua toxicidade para os organismos. Os nanogéis de polissacarídeos, nomeadamente a carragenana são possíveis veículos devido às suas propriedades gelificantes, de estabilidade, biodegradabilidade e fundamentalmente de biocompatibilidade. A carragenana tem a particularidade de formar géis termorreversíveis que aparentam ter grande aplicabilidade na distribuição controlada de fármacos através da pele.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do nanogel de carragenana como possível transportador de fármacos na linha celular HaCaT. Para tal foram utilizados métodos para avaliação da viabilidade celular com brometo de tetrazólio (MTT) associada à análise de ciclo celular por citometria de fluxo (FCM) e o ensaio de micronúcleos com o bloqueio da citocinese (CBMN) que revelaram a diminuição da viabilidade, paragem do ciclo celular e genotoxicidade do nanogel de carragenana para as concentrações que permitiriam a sua utilização como veículo de fármacos.

Com este estudo podemos concluir que o nanogel de carragenana é tóxico para as células HaCaT, não pela toxicidade da própria carragenana nas doses testadas, mas possivelmente por contaminantes empregados na sua síntese, como o CTAB (brometo de cetiltrimetilamónio).

keywords

Drug delivery, nanogel, carrageenan, keratinocyte, toxicity.

abstract

Transdermal drug delivery is useful since it does not cause adverse gastrointestinal effects and allows its controlled release. The use of new biomaterials with properties of technological interest requires an analysis of their toxicity to organisms. The nanogels of polysaccharides, in particular carrageenan are potential vehicles due to their gelling properties of stability, biodegradability and biocompatibility. Furthermore, the carrageenan forms thermosensitive gels that appear to have great applicability in the controlled drug delivery through the skin.

The aim of this study was to evaluate the toxicity of carrageenan nanogel as possible carrier of drugs in cell line HaCaT. Therefore, methods were used for evaluation of cell viability with tetrazolium bromide (MTT) associated with cell cycle analysis by flow cytometry (FCM) and the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) that showed decreased viability, cell cycle arrest and genotoxicity of carrageenan nanogel in concentrations that would allow its use as a drug delivery vehicle.

With this study, we conclude that the carrageenan nanogel is, within the tested doses, toxic to HaCaT cells, not related to toxicity by carrageenan itself but possibly by contaminants employed in their synthesis, such as CTAB (cetyltrimethylammonium bromide).

Índice

I – Introdução	1
1. ENQUADRAMENTO	3
2. TRANSPORTE DE FÁRMACOS	3
2.1. <i>Nanogéis como veículos de transporte de fármacos</i>	4
2.2. <i>Nanogel de κ-carragenana</i>	9
2.2.1. Estrutura molecular e propriedades físico-químicas da carragenana	10
2.2.2. Aplicações gerais da carragenana	13
2.2.3. Atividade biológica e toxicidade da carragenana	14
3. SISTEMA CELULAR EM ESTUDO: ANATOMIA E ORGANIZAÇÃO DA PELE HUMANA	15
3.1. <i>Queratinócitos humanos</i>	17
3.1.1. Linha celular HaCaT como modelo biológico da pele	18
4. AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE UM MATERIAL <i>IN VITRO</i>	20
4.1. <i>Estudo da viabilidade celular</i>	20
4.2. <i>Citometria de fluxo na análise do ciclo celular</i>	21
4.2.1. Princípios da citometria de fluxo	22
4.2.2. Ciclo celular	24
4.3. <i>Análise da genotoxicidade: ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN)</i>	26
II – Objetivos	31
III – Métodos	35
1. PREPARAÇÃO DE NANOESFERAS DE κ -CARRAGENANA PELO MÉTODO DE MICROEMULSÃO REVERSA	37
1.1. <i>Caracterização das nanoesferas através da dispersão dinâmica da luz (DLS)</i>	37
1.2. <i>Quantificação de CTAB</i>	38
2. CULTURA DA LINHA CELULAR HaCaT	39
2.1. <i>Subcultura da linha celular HaCaT</i>	39
2.2. <i>Congelação de células</i>	40
2.3. <i>Descongelamento de células</i>	40
3. ENSAIO DE BROMETO DE 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2, 5-DIFENILTETRAZÓLIO (MTT)	40
4. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	41
5. ENSAIO DE MICRÔNÚCLEOS COM BLOQUEIO DA CITOCINESE (CBMN)	42
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
IV – Resultados	45
1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESFERAS DE κ -CARRAGENANA	47
1.1. <i>Monitorização da remoção de CTAB por FTIR</i>	47
1.2. <i>Análise do diâmetro hidrodinâmico por DLS</i>	47
1.3. <i>Quantificação do CTAB</i>	48
2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA CARRAGENANA E DO NANOGEL DE CARRAGENANA	48
3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO CTAB	50
4. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CARRAGENANA E DO NANOGEL NO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	51
5. AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE CARRAGENANA E NANOGEL ATRAVÉS DO ENSAIO DE MICRÔNÚCLEOS COM O BLOQUEIO DA CITOCINESE	54
V – Discussão	57
VI – Conclusão	63
VII – Referências Bibliográficas	67

Índice de Figuras

FIGURA 1: DIFERENTES MECANISMOS DE ENDOCITOSE (RETIRADO DE(13)).	5
FIGURA 2: ESTRUTURAS DOS POLISSACARÍDEOS MAIS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA (ADAPTADO DE(33)).	8
FIGURA 3: AS DIFERENTES FORMAS COMERCIAIS DE CARRAGENANA (ADAPTADO DE (51)).	10
FIGURA 4: PROCESSO DE GELIFICAÇÃO DA CARRAGENANA (55).	12
FIGURA 5: A PELE E OS SEUS ANEXOS (RETIRADO DE (63)).	16
FIGURA 6: FOTOGRAFIA DE CÉLULAS HACAT AO MICROSCÓPIO ÓTICO (100X).	19
FIGURA 7: CONFIGURAÇÃO DE UM CITÓMETRO DE FLUXO (84).	22
FIGURA 8: CICLO CELULAR (78).	24
FIGURA 9: HISTOGRAMA DE DNA DE UMA CULTURA CELULAR (ADAPTADO DE (78)).	25
FIGURA 10: AS VÁRIAS POSSIBILIDADES DAS CÉLULAS CULTIVADAS COM BLOQUEIO DA CITOCINESE DEPOIS DE EXPOSTAS A AGENTES TÓXICOS (ADAPTADO DE (86)).	28
FIGURA 11: ESTRUTURA QUÍMICA DO CTAB.	38
FIGURA 12: ESPECTROS DE FTIR DE NONOGEL DE K-CARRAGENANA APÓS (A) 10 E (B) 20 CICLOS DE EXTRAÇÃO COM O SOLVENTE PARA A REMOÇÃO DO CTAB.	47
FIGURA 13: DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (ZMÉDIO) DAS NANOESFERAS DE CARRAGENANA EM PBS E DMEM. OS VALORES OS VALORES APRESENTAM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO.	48
FIGURA 14: VIABILIDADE CELULAR (%) PARA EXPOSIÇÕES A CARRAGENANA. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE K-CARRAGENANA E NANOGEL (NP) PARA (A) 6 H, (B) 24 H E (C) 48 H DE EXPOSIÇÃO. OS VALORES APRESENTAM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. AS LETRAS A, B E C INDICAM DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P<0,001).	49
FIGURA 15: VIABILIDADE CELULAR (%) PARA EXPOSIÇÕES A CTAB. EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES CTAB PARA (A) 6 H, (B) 24 H E (C) 48 H DE EXPOSIÇÃO. OS VALORES OS VALORES APRESENTAM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. AS LETRAS A, B E C INDICAM DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS (P<0,001).	50
FIGURA 16: EXEMPLOS DE HISTOGRAMAS DA INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA RELATIVA DO PI OBTIDOS APÓS ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE NÚCLEOS ISOLADOS DAS CÉLULAS HACAT CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA (CONTROLO NEGATIVO) ÀS (A) 6 H, (B) 24 H DE EXPOSIÇÃO.	52
FIGURA 17: DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS EXPOSTAS A CARRAGENANA DE ACORDO COM AS FASES DO CICLO CELULAR. AS CÉLULAS CONTROLO E EXPOSTAS (0,1 E 1 MG·ML ⁻¹ DE CARRAGENANA E 0,1; 0,5 E 1 MG·ML ⁻¹ DE NANOGEL (NP)) APÓS (A) 6 H E (B) 24 H DE EXPOSIÇÃO. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. AS LETRAS A E B INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS P<0,05) EM CADA FASE DO CICLO CELULAR PARA CADA TEMPO DE EXPOSIÇÃO.	53
FIGURA 18: IMAGENS DE MICROCOPIA DE FLUORESCÊNCIA (AMPLIAÇÃO 400X) PARA (A) CÉLULAS CONTROLO EXPOSTAS 6 H A (B) 1 MG·ML ⁻¹ DE CARRAGENANA, (C-E) 0,1; 0,5 E 1 MG·ML ⁻¹ DE NANOGEL. TODAS AS AMOSTRAS FORAM CORADAS COM LARANJA DE ACRIDINA.	55
FIGURA 19: RESULTADOS DO ENSAIO DE CBMN (A) NDI, (B) PERCENTAGEM DE MICRONÚCLEOS, (C) PERCENTAGEM DE APOPTOSE E NECROSE PARA O CONTROLO E 1 MG·ML ⁻¹ DE K-CARRAGENANA APÓS 6 H DE EXPOSIÇÃO. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA ± DESVIO PADRÃO.	56

Índice de Tabelas

TABELA 1: RESUMO DAS PROPRIEDADES DA CARRAGENANA (ADAPTADO DE (55)).	11
TABELA 2: CARACTERÍSTICAS CELULARES E COMPONENTES QUE PODEM SER DETERMINADOS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO (ADAPTADO DE (83)).	23

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
CBMN	Ensaio de micronúcleos com o bloqueio da citocinese, do inglês <i>cytokinesis-block micronucleus assay</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DLS	Dispersão dinâmica da luz, do inglês <i>dynamic light scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxirribonuclease, do inglês <i>deoxyribonuclease</i>
dsRNA	RNA de cadeia dupla, do inglês <i>double - stranded RNA</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FCM	Citometria de fluxo, do inglês <i>Flow Cytometry</i>
FL	Fluorescência relativa
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro, do inglês <i>Generally Recognized As Safe</i>
HPV	Vírus do Papiloma Humano, do inglês <i>Human papillomavirus</i>
IFAC	Concelho Internacional de Aditivos Alimentares, do inglês <i>"International Food Additives Council"</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, do inglês <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
MN	Micronúcleo
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NDI	Índice de divisão nuclear, do inglês <i>nuclear division index</i>
NP	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PLGA	Ácido poli (D, L-lactido-co-glicólico)
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuclease

I – Introdução

1. Enquadramento

O transporte de fármacos deve, sempre que possível, efetuar-se através de vias de administração que não sejam invasivas. A administração de fármacos através da pele, pela via transdérmica, para além de prevenir os eventuais efeitos adversos como acontece por vezes a nível gastrointestinal ainda permite a libertação controlada do fármaco a nível local e sistémico. Para tal, é necessário encontrar veículos que para além da capacidade de transportar os fármacos não sejam tóxicos (1). Os polissacarídeos como alginatos e pectinas têm ganho relevância como transportadores de fármacos (2). No entanto, os géis e consequentemente os nanogéis formados por polissacarídeos como a carragenana apresentam uma grande mais-valia porque são termossensíveis, o que significa que a libertação do fármaco poderá ser controlada através da temperatura (2). Contudo, qualquer nova metodologia de transporte de fármacos terá de ser avaliada através de ensaios em sistemas biológicos.

2. Transporte de fármacos

O transporte de fármacos é o processo de administração de um composto farmacêutico para obter um efeito terapêutico (3). Existem tecnologias que alteram o perfil de absorção, distribuição e eliminação dos fármacos de forma a melhorar a sua eficácia e segurança, bem como a comodidade e a adesão do paciente à terapêutica. As vias de administração são preferencialmente não invasivas através da via oral, transdérmica e inalação. No entanto, muitos medicamentos como péptidos, proteínas e vacinas de anticorpos, geralmente, não podem ser transportados por estas vias, pois são suscetíveis à degradação enzimática ou não são absorvidos para a circulação sistémica de forma eficiente, devido à sua elevada massa molecular ou carga, tendo de ser administrados através da via endovenosa (3).

Recentemente, a administração transdérmica tem vindo a tornar-se um importante sistema de distribuição de fármacos. A pele não é apenas uma via de administração para a terapia local, mas pode também funcionar como uma via para alcançar efeitos sistémicos. O transporte de fármacos através da pele permite a libertação controlada de fármacos e

evita eventuais distúrbios gastrointestinais provocados pela sua passagem, quando administrados pela via oral (4, 5).

Na administração tópica de fármacos em pomadas ou cremes é difícil esperar os seus efeitos, uma vez que a humidade, o movimento e o contacto com o meio envolvente podem facilmente removê-los. Portanto, surge uma necessidade de desenvolver novas formulações com bioaderência adequada. Os géis bioadesivos podem ser aplicados, localizados e removidos facilmente devido à sua excelente acessibilidade, possibilitando a auto-administração da dose necessária (1).

Na indústria farmacêutica, os veículos além de proporcionarem peso, volume, fluidez e consistência ao fármaco, desempenham um papel ativo como potenciadores do seu rendimento em termos de estabilidade, libertação e biodisponibilidade (5, 6). Atualmente, existem diferentes tipos de veículos para a libertação controlada de fármacos como lipossomas, microesferas biodegradáveis e polímeros conjugados carregados com o fármaco (2).

2.1. Nanogéis como veículos de transporte de fármacos

Os nanogéis são partículas de hidrogel com propriedades coloidais, isto é, sistemas que contêm partículas com dimensões entre 1 nm e 1 µm que possuem a capacidade de alterar as propriedades físicas das soluções. Estas nanopartículas apresentam propriedades que as tornam muito interessantes como veículos de distribuição de fármacos porque a nanoestrutura do hidrogel pode ser desenhada para fazer poros com estruturas controladas, topologias químicas e perfis de inchamento que respondem a estímulos ambientais, tais como sinais intracelulares (7). Em simultâneo a macroestrutura dos nanogéis oferece elevada área superficial específica (8) que permite a libertação controlada do fármaco (9).

Os nanogéis termossensíveis oferecem a vantagem adicional de potencialmente sofrerem uma alteração do volume à medida que são aquecidos acima da temperatura crítica, o que resulta numa contração significativa do gel e em alguns casos em agregação desencadeada termicamente formando-se agregados e/ou hidrogéis reticulados (8, 10).

A absorção de nanogéis por parte das células pode ocorrer por fagocitose e/ou pinocitose (Figura 1) e o seu alvo intracelular pode variar com o tipo de célula e/ou um fenótipo de células e as condições de crescimento (11-14). A fagocitose é um mecanismo dinâmico dependente de actina, característica de fagócitos especializados, tais como os

macrófagos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas. As partículas fagocitadas podem ligar-se à superfície dos fagócitos através de recetores específicos, tais como recetores de Fc (Fc-R), recetores de complemento (CR), recetores de manose/frutose e recetores sequestradores (SR). O fagossoma resultante e o seu conteúdo sofrem maturação através de uma série de eventos de fusão e de fissão que levam à transferência do fármaco para fagossomas tardios e, finalmente, lisossomas, formando um fagolisossoma (13, 15). Por sua vez, a pinocitose existe em quase todos os tipos de células, embora cada célula tenha vias distintas, tais como macropinocitose endocítica, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por cavéolas, ou endocitose independente de clatrina/clavéolas.

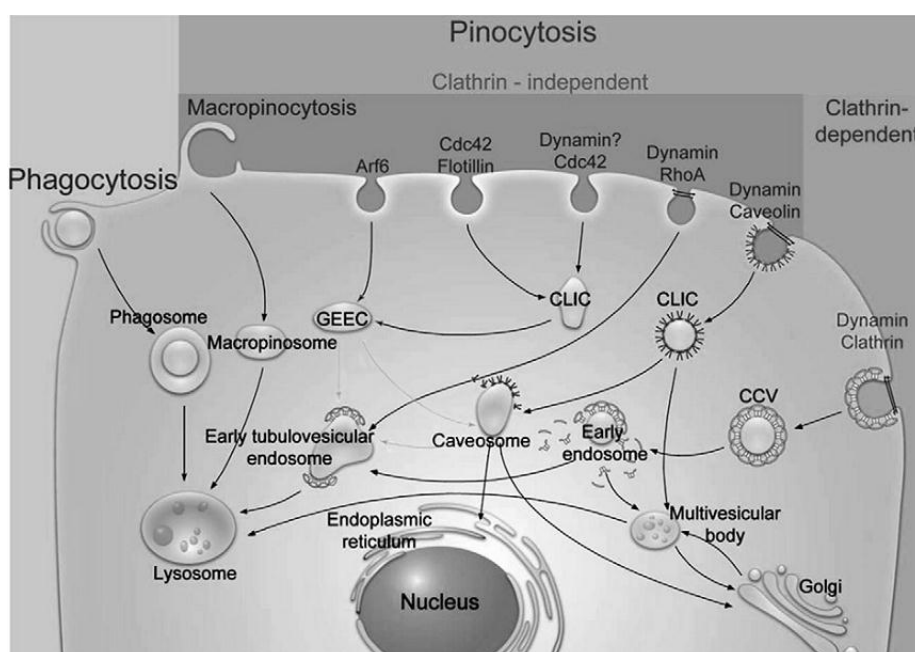


Figura 1: Diferentes mecanismos de endocitose (retirado de(13)).

Nestas vias endocíticas as vesículas diferem na composição do revestimento e tamanho, bem como no destino do fármaco internalizado (16). As nanopartículas podem ser internalizadas por vias múltiplas ou apenas uma. O perfil de absorção celular de quitosana modificada hidrofobicamente envolve várias vias de absorção distintas, tais como macropinocitose, endocitose mediada por clatrina e cavéolas (17). Por outro lado, a absorção de ácido poli (D, L-lactido-co-glicólico) (PLGA) por células musculares lisas arteriais faz-se por um processo dependente de energia que envolve endocitose mediada apenas por clatrina (18). Noutro exemplo, as células de pulmão A549 internalizam nanoesferas de PLGA modificadas ou não com quitosana através de endocitose mediada por clatrina (19).

Os nanotransportadores de fármacos têm sido investigados para distribuição de fármacos para locais anatómicos específicos, tais como tumores do cérebro (20), os olhos (21), pulmões (22), intestino (23), nariz (24) ou pele (25). As nanopartículas têm provado ser eficazes e vantajosas para a absorção de fármacos através da pele. O desenvolvimento de sistemas de administração transdérmica eficazes tem sido limitado devido à barreira de penetração significativa fornecida pelo estrato córneo. No entanto, há um interesse crescente no desenvolvimento de sistemas eficientes de distribuição de fármacos dirigidos a locais específicos da pele (26, 27).

Nas áreas da dermatologia e cosmetologia as partículas micro e nanométricas têm sido exaustivamente estudadas e algumas formulações já estão disponíveis comercialmente. As nanopartículas lipídicas sólidas e nanocápsulas lipídicas têm mostrado aumentar a permeação através da pele. No entanto, devido à capacidade de carga de fármacos limitada e problemas ao nível da estabilidade de fase, a sua aplicação clínica é limitada. Portanto, tem sido dada uma maior atenção às nanopartículas poliméricas não-tóxicas e biodegradáveis sintéticas ou semi-sintéticas, incluindo o ácido poliláctico (28), o PLGA (29), a poli (ϵ -caprolactona) (30) e a quitosana (31) têm mostrado resultados promissores para a distribuição tópica de fármacos. Estas nanopartículas poliméricas oferecem vantagens de libertação controlada e sustentada através de modificação da composição do polímero e redução da irritação associada ao contacto direto do fármaco com a pele (27).

A seleção do veículo para o transporte de fármacos deve obedecer a alguns critérios:

- Estabilidade de encapsulamento: as moléculas de fármaco devem ser estavelmente encapsuladas de modo a não se libertarem prematuramente. Isto é essencial para garantir a eficácia terapêutica máxima, com efeitos secundários mínimos.
- Resposta a estímulos: a estabilidade de encapsulamento é desejável durante a circulação mas, uma vez no destino, o medicamento deve ser libertado.
- Direcionamento passivo: este aspeto é fundamental para o direcionamento do fármaco para diversas doenças, como o cancro ou artrite. Este aspeto depende do tamanho no nanogel que também determina o tempo de circulação ou de depuração.

- Direcionamento ativo: esta estratégia é utilizada para atacar fenótipos específicos de doenças e assim reduzir os efeitos secundários. Um sistema de administração deve permitir no seu *design* a ligação a ligandos alvo ativos.
- Toxicidade: o veículo deve ser não tóxico e preferencialmente metabolizado em produtos não tóxicos que são eliminados do corpo.
- Facilidade de síntese: o aspeto menos importante para as investigações de laboratório mas crucial para a produção em escala industrial e aprovação final dos órgãos reguladores para a sua comercialização.

Para a aplicação prática de administração de fármacos, mesmo que todos os critérios de conceção acima sejam satisfeitos, em última análise a toxicidade inerente ao veículo decide a sua utilidade. A conceção de um veículo não tóxico envolve a escolha de materiais que são não-tóxicos e que depois de metabolizados se transformam em compostos não tóxicos, não apresentando riscos para o consumidor (9).

Atualmente, os biomateriais, compostos naturais ou sintéticos que atuam nos sistemas biológicos, são considerados componentes essenciais para a engenharia de sistemas modificados de distribuição de fármacos (2), entre os quais se destacam os polissacarídeos naturais e/ou seus derivados, devido à sua estabilidade, disponibilidade, renovabilidade e baixa toxicidade (2, 32, 33). Para além disso, os polissacarídeos são muito atrativos como veículos de transporte de fármacos, devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, pois desempenham a sua função com o mínimo de reações adversas, como a degradação de enzimas, desencadeamento de respostas imunes, reações alérgicas e depleção de eletrólitos. Outras vantagens prendem-se com a sua elevada viscosidade e propriedades gelificantes, visto que formam uma barreira de difusão, que lhes permite controlar a cinética de libertação dos fármacos (2, 32).

Os polissacarídeos podem ser utilizados como matrizes sólidas que incorporaram fármacos em diferentes formas, tais como: monólitos, onde os géis se formam num molde cilíndrico e/ou esférico, micro- e nanopartículas. Desta forma, a capacidade de carga do fármaco, o perfil de libertação e a sua biodisponibilidade são grandemente influenciados pela estrutura química, porosidade e área superficial da matriz de base polisacarídica (2).

A grande variedade de polissacarídeos permite a sua utilização em produtos farmacêuticos com diferentes vias de transporte, órgãos-alvo e/ou perfis de libertação do

fármaco (32, 34). Os sistemas semi-sólidos de libertação de fármacos são especialmente, interessantes para o transporte de fármacos através da pele. Estes apresentam a capacidade de se fixarem à superfície de aplicação, o que permite uma distribuição uniforme sob a forma de um filme imóvel (34). Os polissacarídeos estão, geralmente, presentes em baixas concentrações que variam entre 0,5 a 2%. Este é o caso do gel de agar, que é fluído a temperaturas elevadas, mas solidifica próximo da temperatura ambiente devido a um aumento nas interações entre cadeias. Os polissacarídeos naturais frequentemente utilizados para a preparação de géis na indústria farmacêutica incluem pectinas, carragenana, agar, e alginatos (2, 33), cujas estruturas básicas estão representadas na Figura 2.

A utilização de polissacarídeos naturais, como gelatina (35) e quitosana (36), no desenvolvimento de hidrogéis deve-se à sua biocompatibilidade inerente. No entanto, apresentam uma desvantagem comum, a instabilidade estrutural e térmica das matrizes, que pode ser melhorada através da utilização de reticuladores, como o formaldeído (37) e glutaraldeído (38). Uma vez que estes são compostos citotóxicos, permanece a necessidade de encontrar reticuladores de fontes naturais com maior biocompatibilidade ou de polímeros mais estáveis (39).

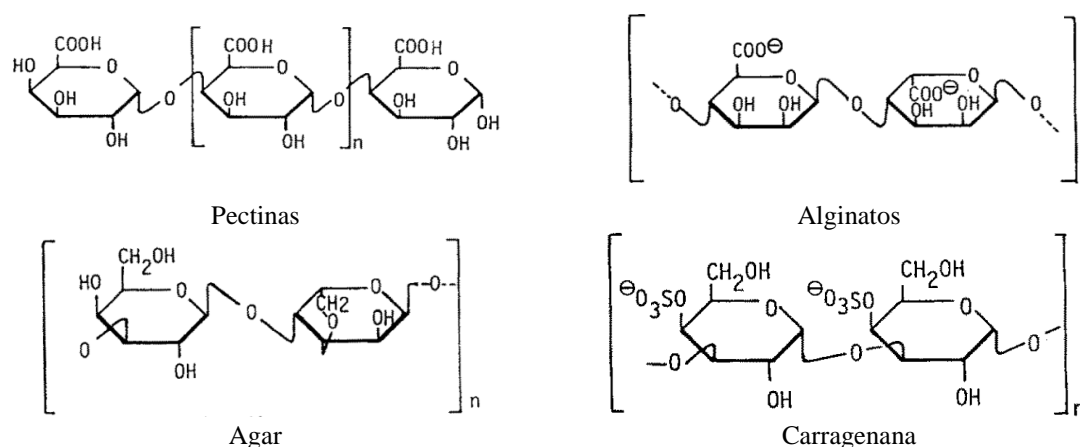


Figura 2: Estruturas dos polissacarídeos mais utilizados na indústria farmacêutica (adaptado de(33)).

A goma gelana tem muitas aplicações na distribuição de fármacos oftalmológicos (40) e orais em formulações de gelificação sustentada *in situ* (41) e esferas de distribuição sustentada (42). A xiloglucana foi testada como gel, por via retal (43), intraperitoneal(44) e oral em formulações de gelificação *in situ* (45). A carragenana e a pectina têm sido utilizadas em estudos de libertação controlada de fármacos orais (46).

2.2. Nanogel de κ -carragenana

As nanopartículas de hidrogel (também referidas como nanogéis ou nanoesferas) têm diâmetros ajustáveis e a rede de gel interno pode ser utilizada para a incorporação de agentes terapêuticos. Os nanogéis preparados a partir de hidrogéis são de particular interesse, visto que estímulos externos, tais como o pH e temperatura, podem causar alterações na ordem da malha de gel, dimensões e interações das partículas, que leva à liberação controlada de agentes terapêuticos encapsulados (47, 48).

As partículas de hidrogel sensíveis à temperatura descritas até agora para aplicações de distribuição de fármacos são principalmente à base de polímeros sintéticos, incluindo copolímeros de poli-N-isopropilacrilamida, poli (óxido de etileno-propileno) e seus copolímeros, e copolímeros de poli (óxido de etileno)/PLGA. Enquanto polímeros sintéticos também podem fornecer propriedades controláveis e consistentes, os biopolímeros têm várias vantagens sobre as aplicações biomédicas, sendo intrinsecamente mais biodegradáveis, não tóxicos, renováveis, abundantes na natureza e relativamente baratos. No entanto, do que se sabe, poucas descrições existem sobre a preparação de partículas termossensíveis de hidrogel a partir de polímeros naturais. Os micro/nanogéis de gelatina, por exemplo, têm sido amplamente investigados como transportadores de fármacos, mas só muito recentemente tem sido dada atenção às propriedades destas partículas termossensíveis (49).

A natureza termossensível de hidrogéis de κ -carragenana torna este biopolímero um candidato interessante para aplicações de distribuição de fármacos ativada pela temperatura. Além disso, a estrutura de κ -carragenana inclui uma variedade de grupos químicos funcionais, que proporcionam a possibilidade de posterior derivação e bioconjugação, como foi recentemente confirmado pela carboximetilação de κ -carragenana e ligação a um anticorpo adicional (50).

Quando se consideram as aplicações de distribuição de fármacos, a carragenana tem sido investigada na forma de microgéis. Embora o uso eficaz de biopolímeros como veículos de fármacos seja dependente da via de administração, os outros parâmetros, tais como o diâmetro das partículas também são críticos na determinação do seu desempenho. A κ -carragenana tem sido investigada em forma de nanopartículas incorporadas em dispersões ou em mistura com outros polímeros, mas tanto quanto se sabe, foi

desenvolvido apenas um nanogel de κ -carragenana pura por Daniel-da-Silva e colaboradores (49), cuja biocompatibilidade continua por apurar.

2.2.1. Estrutura molecular e propriedades físico-químicas da carragenana

As carragenanas são uma família de polissacarídeos de elevada massa molecular (100 – 1000 kDa). Estes polissacarídeos são produzidos por algumas espécies de algas vermelhas Rhodophyta, sendo a principal fonte a *Chondrus crispus* (51-54). A carragenana comercial é obtida através de extração alcalina, este passo influencia as propriedades de dispersão, hidratação, espessamento e gelificação da carragenana. Se a extração alcalina for muito extensa, as cadeias formam ligações mais fortes e apresentam menor deformação antes de quebrarem, mas os géis formados são mais frágeis. Subsequentemente é efetuada a precipitação com álcool isopropílico ou, no caso de extratos para a obtenção seletiva de κ -carragenana, com cloreto de potássio, seguida de secagem e maceração dos extratos (51, 55).

As carragenanas são hidrocolóides, ou seja, apresentam a capacidade de alterar as propriedades físicas de outros compostos, e consistem em copolímeros de ésteres de potássio, sódio, cálcio, magnésio e sulfato de amónio de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose ligadas alternadamente por ligações α -1,3 e β -1,4 (Figura 3) (52, 56). A κ -carragenana consiste, essencialmente, num polímero de D-galactose-4-sulfato e 3,6-anidro-D-galactose com ligações α -1,3. A ι -carragenana é semelhante, mas possui a 3,6-anidro-D-galactose sulfatada no segundo carbono. Por sua vez, a λ -carragenana é composta por unidades monoméricas alternadas de D-galactose-2-fosfato e D-galactose-2,6-dissulfato com ligações α -1,3 e β -1,4, respetivamente (53, 54). Nos produtos comerciais a κ -carragenana contém, aproximadamente, 22% (p/p) de sulfato, enquanto a ι - e a λ -carragenana possuem 32 e 38% (p/p), respetivamente. Para além de galactose e sulfato também podem estar presentes outros resíduos glucídicos, como xilose, glucose e ácidos urónicos, assim como alguns metil-ésteres e grupos piruvato (51).

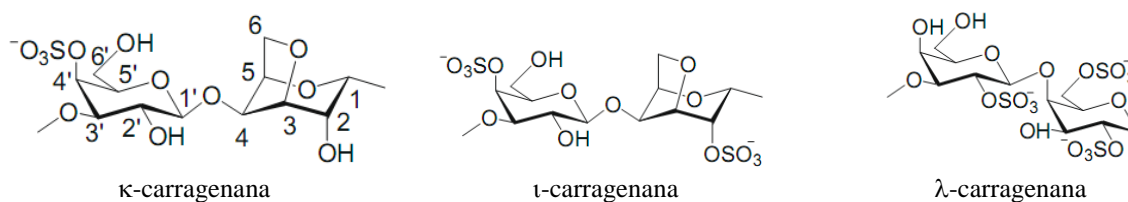


Figura 3: As diferentes formas comerciais de carragenana (adaptado de (51)).

Qualquer uma das estruturas de carragenana é solúvel em água, sendo insolúvel em solventes orgânicos. No entanto, a sua solubilidade em água depende da sua ligação a cátions e do grau de sulfatação das moléculas, visto que estes grupos são muito hidrofílicos. A razão entre a fração sulfatada e o equilíbrio dos cátions em solução determina a viscosidade das soluções ou a força dos géis formados pela carragenana, determinando as suas aplicações (51). As κ - e ι -carragenanas formam géis termorreversíveis em soluções aquosas, diminuindo a sua rigidez com o grau de sulfatação, sendo por esta razão que a λ -carragenana não forma géis, mas soluções altamente viscosas (57). A viscosidade das soluções de carragenana depende da temperatura, da presença de outros solutos, do tipo de carragenana e da massa molecular, e aumenta exponencialmente com a sua concentração (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo das propriedades da carragenana (adaptado de (55)).

Tipo de carragenana		λ	ι	κ
Solubilidade	Água quente (80 °C)	Solúvel	Solúvel	Solúvel
	Água fria (20 °C)	Todos os sais solúveis	Sais de sódio solúveis	Sais de sódio solúveis
	Leite quente (80 °C)	Solúvel	Solúvel	Solúvel
	Leite frio (20 °C)	Espesso	Insolúvel	Insolúvel
	Soluções açucaradas (50%)	Solúvel	Insolúvel	Solúvel a quente
	Soluções salinas (10%)	Solúvel a quente	Solúvel a quente	Insolúvel
Gelificação	Efeito de cátions	Não gelifica	Géis mais fortes com cálcio	Géis mais fortes com potássio
	Textura do gel	Não gelifica	Suave, elástico	Firme, frágil
	Sinérese	Não gelifica	Não	Sim
	Histerese	Não gelifica	5 -10 °C	10 - 20 °C
	Estabilidade ao congelamento/descongelamento	Sim	Sim	Não
	Sinergia com goma de alfarroba	Não	Não	Sim
	Sinergia com galactomananas	Não	Não	Sim
	Sinergia com amido	Não	Sim	Não
	Reversibilidade de fraturas	Sim	Sim	Não
	Estabilidade ácida	Hidrólise	Hidrólise em solução, acelerada pela temperatura; géis são estáveis	
	Reatividade proteica	Grande interação proteica em meio ácido		Reage com κ -caseína

A gelificação da carragenana, especialmente a κ -carragenana, envolve dois processos separados e sucessivos: formação de uma hélice com o abaixamento da temperatura e subsequente agregação entre hélices dependente de cátions. A presença de cátions adequados, normalmente potássio e cálcio, é um requisito essencial para o processo de gelificação. Desta forma, o aumento da viscosidade pode ocorrer através de dois

processos diferentes: (i) interações entre cadeias lineares, com a diminuição dos espaços livres ou aumento do volume de exclusão; (ii) formação física de géis devido a ligações cruzadas entre as cadeias (Figura 4). No primeiro caso, o aumento da concentração das macromoléculas permite uma maior interação entre as cadeias, e a presença de sais pode diminuir a viscosidade através da redução das repulsões electrostáticas entre os grupos sulfato. No segundo caso, exclusivo para κ - e ι -carragenana, para pequenas concentrações de sais a baixas temperaturas a carragenana pode gelificar com um aumento aparente da viscosidade. No entanto, a viscosidade das soluções de carragenana diminui com o aumento da temperatura (51).

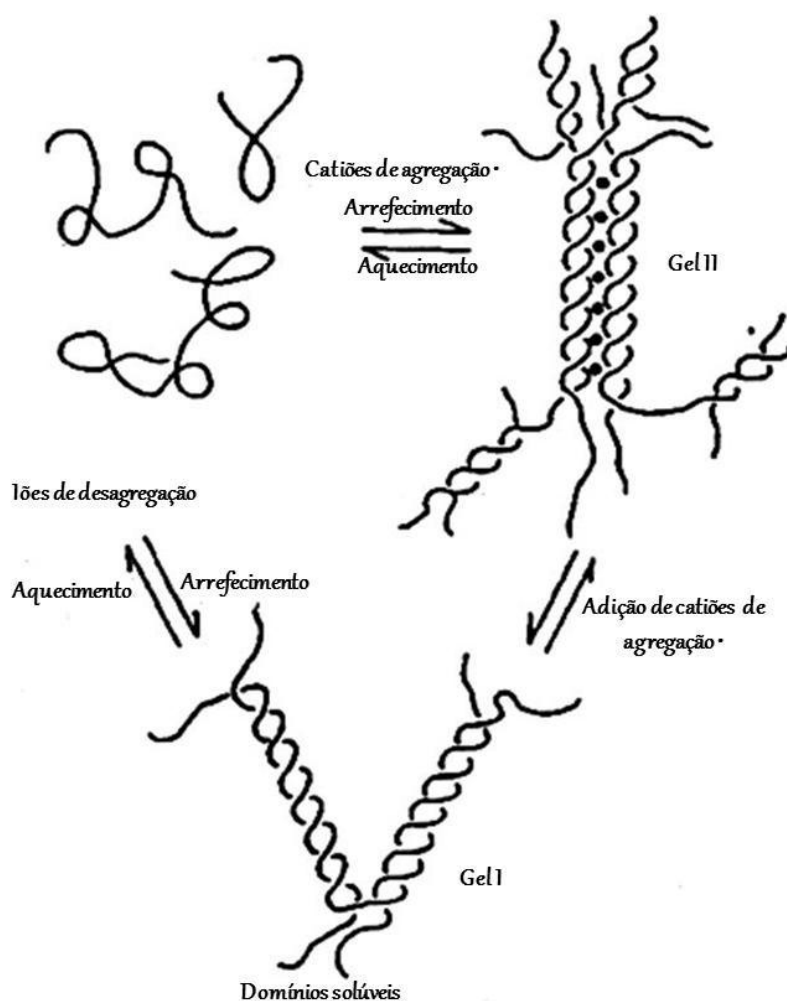


Figura 4: Processo de gelificação da carragenana (55).

A κ - e a ι -carragenana formam estruturas tridimensionais de duplas hélices, resultantes das ligações cruzadas entre hélices adjacentes, que contêm grupos sulfato orientados para o exterior da molécula. No caso da λ -carragenana os grupos 2-sulfato estão

orientados para o interior da molécula, evitando as ligações cruzadas. Os iões potássio têm a capacidade de se introduzirem nas duplas hélices e de neutralizarem as cargas dos grupos sulfato, o que facilita a aproximação entre as cadeias, promovendo a sua estabilização (51).

A carragenana pode dar origem a poligenanas, polímeros de galactose sulfatados com uma massa molecular média de 15 kDa. A degradação da carragenana ocorre devido a hidrólise ácida, temperaturas elevadas (superiores a 80 °C), processamento mecânico ou ação bacteriana (57). Devido à sua baixa massa molecular as poligenanas não possuem a viscosidade e propriedades de gelificação da carragenana e, portanto não possuem as mesmas aplicações (56). A carragenana comercial contém baixa concentração em poligenanas, representando menos de 5% da composição total do produto. Isto deve-se ao facto da extração da carragenana decorrer em condições alcalinas, evitando-se portanto a sua degradação. Desde que o pH seja mantido acima de 6,0 a carragenana é estável ao calor de processamento, uma vez que se encontra na forma de gel, como é o caso da sua utilização na indústria alimentar, tornando-se altamente resistente à degradação, mesmo em condições ácidas (51-53).

2.2.2. Aplicações gerais da carragenana

A carragenana forma espontaneamente soluções viscosas a temperaturas mais elevadas que a temperatura de solubilização, tornando-a um composto de interesse tecnológico abundantemente utilizado na indústria alimentar como espessante, gelificante, emulsionante e estabilizante para uso *quantum satis*, o nível exigido para alcançar o benefício tecnológico (56). Este polissacarídeo tem sido utilizado para melhorar a textura do requeijão, para controlar a viscosidade e textura de pudins e sobremesas lácteas e, como aglutinante e estabilizador na indústria de processamento de carne e, no fabrico de salsichas e hambúrgueres de baixo teor em gordura (51). Apesar da sua vasta utilização em alimentos, este polímero não possui nenhum valor nutritivo, segundo a International Food Additives Council (IFAC) e Marinalg International (53).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) considera a carragenana segura para a alimentação (*Generally Recognized As Safe* – GRAS) e concluiu que não é necessário estabelecer um limite de ingestão diária recomendada (55). Enquanto a União Europeia aprovou a carragenana como espessante, gelificante, emulsionante e estabilizante atribuindo-lhe a designação de E407. Para tal, a carragenana deve ser extraída de algas e

conter menos de 2% de material ácido insolúvel. No entanto, a maior parte da carragenana produzida tradicionalmente contém menos de 0,5%, produzindo géis claros e transparentes. A matéria insolúvel em ácido consiste principalmente numa rede de celulose que modifica a aparência, hidratação e características do gel (55).

Para além da indústria alimentar têm surgido outras áreas como a indústria farmacêutica, cosmética (51, 56), impressão e têxtil nas quais a carragenana se tem mostrado muito útil. Este polissacarídeo tem sido utilizado para estabilizar preparações de pasta de dentes, absorver fluidos corporais, quando incorporado em curativos, e em loções para as mãos e champôs. Estes polissacarídeos provaram a sua utilidade também como veículo de comprimidos, devido à boa biocompatibilidade, robustez e elevada viscoelasticidade persistente do comprimido durante a compressão, características que o tornam um veículo adequado para formulações de transporte sustentado de fármacos (51).

2.2.3. Atividade biológica e toxicidade da carragenana

A carragenana ingerida na forma de gel é estável nas condições de passagem pelo aparelho digestivo, sendo menos de 6% da carragenana excretada com massa inferior a 100 kDa e menos de 1% inferior a 50 kDa. Consequentemente, a carragenana permanece dentro do lúmen do trato digestivo e não é absorvida. Além disso, estudos realizados em ratos e outros modelos animais demonstram que não existe excreção através da urina, o que sugere a ausência de efeitos sistémicos. Pode concluir-se então, que a carragenana não é absorvida pelo intestino através da administração oral, não sendo também metabolizada em moléculas de menor massa molecular (53). Estudos realizados em animais, microrganismos e células animais indicam que a carragenana não é citotóxica, carcinogénica nem genotóxica (53). Segundo estudos efetuados *in vivo*, a administração sistémica de carragenana interfere especificamente com as células do sistema imunitário (56), no entanto, como não é absorvida pelo trato gastrointestinal não existe risco da sua utilização em alimentos ou bebidas (53).

Alguns autores não fazem a distinção entre carragenanas e poligenanas, e atribuem efeitos nocivos na mucosa intestinal, como úlceras e neoplasias (51) à carragenana. Segundo Tobacman (58), a carragenana desencadeia este tipo de patologias no epitélio intestinal através da redução da proliferação celular, paragem do ciclo celular e por fim a morte das células (58, 59). Mais recentemente, o estudo realizado por Bhattacharyya (57)

revelou que o tratamento da carragenana, com uma enzima com atividade de α -1,3 galactosidase, pode levar a uma redução da resposta inflamatória. Uma das soluções seria a colonização do intestino com bactérias que produzam esta enzima.

É fundamental distinguir carragenana de poligenana, visto que possuem aplicações e propriedades toxicológicas completamente diferentes, sendo que a carragenana se tem mostrado não tóxica através da exposição por via oral, transdérmica e inalação, o que não acontece para as poligenanas (53, 56). Como alguns investigadores não fazem a distinção correta entre poligenanas e carragenana, acabam por imputar efeitos nocivos das poligenanas à carragenana. Neste contexto foram realizados estudos que revelam que o processamento normal não aumenta significativamente a razão poligenana/carragenana e que a presença de catiões impede a hidrólise da carragenana (60).

Além disso, a carragenana apresenta também várias propriedades farmacêuticas, imunomoduladoras, antitumorais, anti-hiperlipidémicas (51) e atividade anticoagulante (51, 52). Estudos *in vitro* sugerem que a carragenana pode ter propriedades antivirais, inibindo a replicação do herpes e vírus da hepatite A (51). Um estudo realizado em HaCaT por Ren e colaboradores (61) afirma que a carragenana associada ao colagénio tem propriedades protetoras contra radiação ultravioleta, funcionando como antioxidante e diminuindo a apoptose. Recentemente, demonstrou-se que a carragenana inibe a infeção do vírus do papiloma humano (*Human Papilloma Virus* – HPV) e existem evidências de que géis lubrificantes sexuais constituídos por carragenana podem oferecer proteção contra a transmissão do HPV (62).

3. Sistema celular em estudo: anatomia e organização da pele humana

A pele é o maior órgão do corpo humano, funciona como uma barreira física ao meio ambiente, permitindo a passagem seletiva de água, eletrólitos e outras substâncias para dentro e para fora do organismo, proporcionando proteção contra a desidratação, microrganismos, radiação ultravioleta, agentes tóxicos e lesões mecânicas (63, 64). A pele é um órgão dinâmico, em constante mudança, sendo as células das camadas exteriores continuamente substituídas por células de camadas mais internas que se deslocam até à superfície (64).

A pele humana é composta por três camadas: epiderme, derme e tecido conjuntivo (Figura 5). A epiderme corresponde a um epitélio estratificado composto maioritariamente por queratinócitos que são formados pela divisão de células da camada basal, e dão origem a várias camadas distintas de células (camada espinosa, granular e córnea) que se movem para a superfície e à medida que se diferenciam (63).

A camada basal, a mais interna da epiderme, adjacente à derme compreende principalmente queratinócitos em divisão e não-divisão, que estão ligados à membrana basal por hemidesmossomas. É nesta camada que se encontram também os melanócitos que produzem o pigmento melalina, transferindo-a para os queratinócitos oferecendo-lhes proteção contra radiação ultravioleta, aumentando a relação dos melanócitos/queratinócitos. As células de Merkel também se encontram na camada basal, intimamente associadas aos nervos cutâneos, estando envolvidas na sensibilidade ao toque (63, 64).

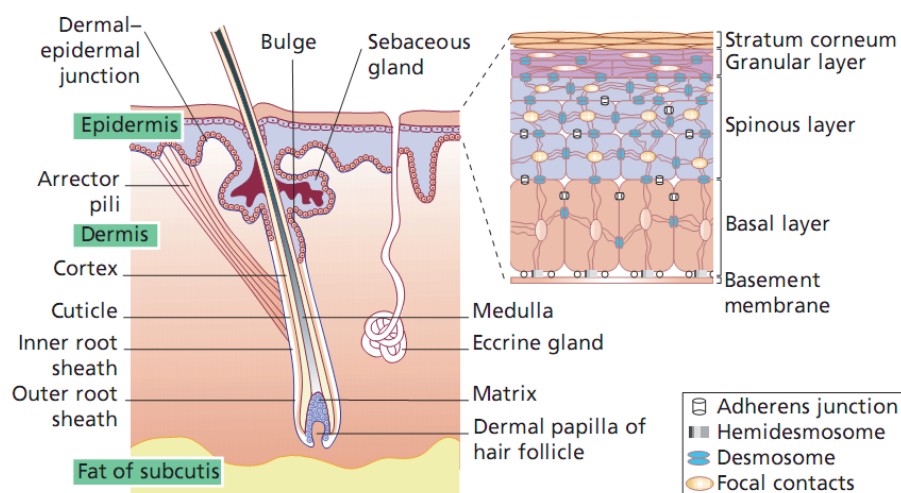


Figura 5: A pele e os seus anexos (retirado de (63)).

Como as células basais se reproduzem e amadurecem, movendo-se em direção à superfície da pele, formam inicialmente a camada espinhosa. Os desmossomas formam pontes intercelulares, que se parecem com “espinhos” ao nível microscópico. As células de Langerhans são dendríticas, imunologicamente ativas, derivadas da medula óssea, e encontram-se em todas as camadas da epiderme, mas estão localizados principalmente nesta camada, desempenhando um papel importante em respostas imunitárias da pele (63, 64).

No estrato granuloso, os queratinócitos continuam a achatar-se durante a sua transição até à superfície, perdendo o seu núcleo e o seu citoplasma granular aparecer nesta camada (63, 64).

O resultado final da maturação dos queratinócitos é o estrato córneo, composto por camadas de queratinócitos hexagonais, células não viáveis cornificadas, designadas por corneócitos. Na maior parte da área da pele existem entre 10 e 30 camadas de corneócitos empilhados. Cada corneócito é coberto por um envelope de proteínas cheio de queratinas retentoras de água envoltas por bicamadas lipídicas, esta estrutura funciona como uma barreira física natural retentora da água da pele. A camada de corneócitos pode absorver três vezes o seu peso em água, mas se o seu teor de água cai abaixo de 10% já não permanece maleável e danifica-se (63, 64).

3.1. Queratinócitos humanos

Os queratinócitos são o tipo mais comum de células da pele, responsáveis pela síntese de queratina, uma proteína que proporciona resistência à pele, cabelo e unhas. Os genes de queratina têm perfis de expressão muito específicos, cada um dos tecidos epiteliais altamente especializados tem o seu próprio perfil de expressão. O cabelo e as unhas expressam queratinas modificadas, que contêm grandes quantidades do aminoácido cisteína, formando inúmeras ligações químicas cruzadas para fortalecer ainda mais o citoesqueleto dos queratinócitos (63). Além das suas propriedades estruturais, a queratina também pode ter um papel direto na sinalização celular, na resposta ao *stress* e apoptose (63, 64). A produção de queratina é regulada através dos níveis de vitamina A, fatores de crescimento, hormonas e sinais mesenquimais, que podem também direcionar ou permitir padrões intrínsecos de diferenciação dos queratinócitos (63).

Os queratinócitos além de possuírem funções estruturais ao nível da epiderme, também participam ativamente na resposta imunitária, processos inflamatórios e cicatrização de feridas, devido à sua capacidade de sintetizar uma grande variedade de citocinas, fatores de crescimento e fatores do complemento, um grupo de proteínas plasmáticas que interagem sequencialmente produzindo substâncias que medeiam a resposta inflamatória (64, 65). Assim, quando se pretende estudar fármacos e/ou veículos para administração via transdérmica, começando por ensaios *in vitro*, é fundamental testar

a sua biocompatibilidade em queratinócitos, visto que estas são as células mais abundantes na pele.

3.1.1. Linha celular HaCaT como modelo biológico da pele

Atualmente, as culturas de células têm vindo a tornar-se uma das ferramentas mais utilizadas nas ciências da vida (66). As culturas de células primárias consistem em células removidas cirurgicamente de um órgão e colocadas num meio de cultura adequado às suas necessidades, onde se fixam, no caso de células aderentes, dividem e crescem e geralmente possuem um tempo de vida e potencial de crescimento limitado. A primeira subcultura representa uma transição marcante para a cultura. A necessidade de uma subcultura implica que a cultura primária tenha crescido e consumido todo o substrato disponível (66).

A transformação de culturas implica uma alteração do seu fenótipo que é dependente da introdução de novo material genético nas células e requer alterações fenotípicas permanentes que podem ser espontâneas, após a exposição a radiação ionizante ou a químicos cancerígenos, ou induzidas através de infeção com vírus ou transfeção. A transformação está associada à instabilidade genética na qual podem ocorrer três tipos de alterações expressas pelas células individualmente ou em simultâneo: (i) imortalização, a aquisição de um tempo de vida infinito; (ii) controlo do crescimento aberrante, que consiste na perda de inibição por contato, limitação da densidade da proliferação celular e dependência da fixação; (iii) malignidade, tal como demonstrado pelo crescimento de tumores *in vivo* (67). A imortalização define-se como a aquisição de um tempo de vida infinito isoladamente, sem o crescimento aberrante e malignidade que normalmente lhe estão associados. As células normais apresentam geralmente um tempo de vida limitado de 20 a 100 gerações, enquanto as células imortalizadas têm a capacidade de produzir linhas celulares com tempo de vida infinito (67).

As células epidérmicas normais de origem de roedores podem ser malignamente transformadas e imortalizadas *in vitro* por diversos agentes, podem também passar por conversão neoplásica espontânea após períodos variáveis em cultura (68). No entanto, a imortalização de células humanas constitui um desafio maior, uma vez que a incidência de transformação neoplásica noutras espécies parece correlacionar-se com a frequência de aberrações cromossómicas espontâneas, sendo a baixa incidência de transformação

completa de células humanas em cultura atribuída principalmente à maior estabilidade do genoma humano (69).

O trabalho desenvolvido por Boukamp (70) descreve a imortalização espontânea *in vitro* de queratinócitos histologicamente normais da pele de adultos humanos. O isolamento das células foi feito a partir da periferia de um melanoma de um paciente de 62 anos de idade, do sexo masculino (65, 70). A linha celular imortalizada a partir destas células altamente diferenciadas foi denominada de HaCaT (Figura 6) para indicar a origem e as condições de crescimento inicial – *human adult skin keratinocytes propagated under low Ca^{2+} conditions and elevated temperature*. Esta linha é de origem clonal, segundo marcadores citogenéticos específicos e estáveis, tem um fenótipo transformado *in vitro* que não é tumoral, o que demonstra claramente, que a transformação espontânea de células humanas *in vitro* pode ocorrer (70).

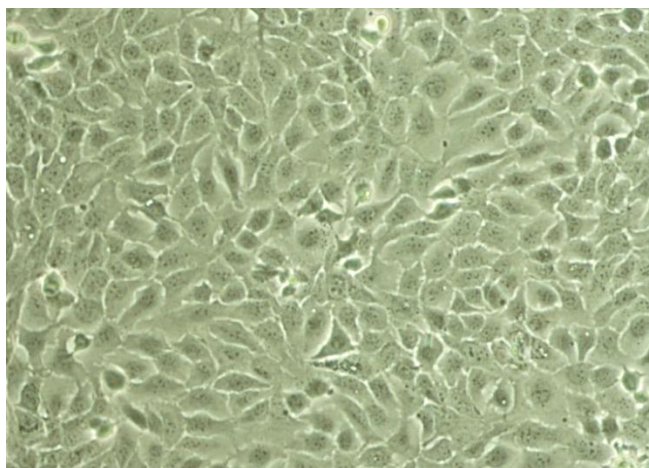


Figura 6: Fotografia de células HaCaT ao microscópio ótico (100x).

A linha celular HaCaT pode ser considerada imortal porque é possível efetuar mais de 140 passagens sem ocorrerem alterações no seu genoma. Mesmo depois de várias passagens as HaCaT mantêm uma extraordinária capacidade de diferenciação normal e expressão constante de queratinas específicas, tornando-as um modelo estável para estudos *in vitro* de diferenciação celular da epiderme (70) e proliferação celular em diferentes de ensaios de citotoxicidade (65, 70).

A linha celular HaCaT tem sido utilizada como modelo biológico devido às características referidas. Neste contexto têm sido realizados muitos estudos que se centram na análise da expressão genética para a caracterização das HaCaT submetidas a diversas

condições experimentais como a exposição a compostos irritantes (ácido láctico, hexano e isopropanol) ou sensibilizantes (sulfato de níquel e eugenol) (71), radiação ultravioleta (72, 73) e compostos com propriedades biomédicas como flavonoides (74) e ginsenoides (75).

Schoop e colaboradores (76) estudaram o processo de diferenciação da linha HaCaT através de microscopia de imunofluorescência e verificaram que apesar da hiperproliferação, diferenciação prematura e paraqueratinose, desaparecimento da camada granulosa da pele e persistência de células com núcleo de camada córnea (como em eczema e psoríase), estas células continuam a possuir a capacidade de reconstruir um epitélio bem estruturado e diferenciado.

Os testes realizados para analisar o metabolismo da testosterona em HaCaT através de LC-MS identificaram vários metabolitos, como 5 α -androstano-3 α , 17 β -(diol) (adiol), 5-dihidrotestosterona, androsterona, andros-4-ona e 5 α -androstano-3,17-diona, demonstrando mais uma vez que esta linha celular tem um metabolismo muito próximo das células normais da pele, sendo os estudos com a linha celular mais reprodutíveis (77).

4. Avaliação da biocompatibilidade de um material *in vitro*

A análise da citotoxicidade de um composto é um processo elaborado que deve ter em conta parâmetros biológicos como a viabilidade celular, que permitem verificar o estado das culturas e comparar a integridade das células expostas ao agente potencialmente citotóxico com o controlo.

4.1. Estudo da viabilidade celular

A estimativa rápida e precisa da viabilidade celular é vital para o sucesso de culturas de células e avaliação das propriedades citotóxicas ou toxicológicas de compostos usados experimentalmente (78).

Os ensaios de viabilidade celular mais comuns baseiam-se em dois tipos de parâmetros: a integridade da membrana celular e a atividade metabólica (79).

Os testes que se baseiam na integridade das membranas são mais simples e rápidos e, portanto, são utilizados rotineiramente em laboratório. Estes métodos podem também ser

designados por ensaios de exclusão do corante, porque distinguem as células viáveis das não viáveis através da capacidade que as células viáveis têm de excluir o corante graças à sua membrana intacta, enquanto as células mortas o retêm. Nestes ensaios de viabilidade conta-se o número de células viáveis numa população, que combinado com o número total de células, fornece uma indicação do estado da cultura, o azul de tripano é o corante mais frequentemente utilizado para avaliação da viabilidade celular (79).

No entanto, uma avaliação mais objetiva carece da realização, sempre que possível, de uma análise quantitativa dos efeitos citotóxicos do biomaterial testado, havendo para o efeito, várias técnicas disponíveis, das quais se destaca o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio). Este ensaio avalia a atividade metabólica através da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, que pode ser afetada após a exposição das células a um ambiente tóxico (80). Esta enzima tem a capacidade de reduzir o MTT, que é solúvel em água e tem tonalidade amarela e de cristais de formazano (de cor púrpura). Após a incubação com MTT é necessário adicionar um solvente orgânico como o dimetilsulfóxido (DMSO) ou isopropanol para parar a reação e solubilizar o formazano. A quantidade de formazano produzido é observada através da absorvância a 570 nm e correlaciona-se diretamente com o número de células viáveis (79) porque apenas as células vivas são capazes de metabolizar o MTT, obtendo-se desta forma uma medida da viabilidade e da proliferação celular (79, 81). Esta técnica é rápida e eficaz para determinar a percentagem de viabilidade em ensaios de proliferação, citotoxicidade, adesão celular, quimiotaxia, e apoptose e tem-se verificado particularmente útil para avaliar suspensões de células devido à sua especificidade para células vivas (67). No entanto, devido às diferenças entre os diferentes tipos de células e condições de cultura, é necessário construir uma curva padrão para cada linha celular (78).

4.2. Citometria de fluxo na análise do ciclo celular

A citometria de fluxo (FCM) é uma técnica utilizada para contar, analisar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido num fluxo e permite a análise de vários parâmetros simultaneamente. Esta técnica foi utilizada pela primeira vez nas áreas da oncologia e hematologia, mas nos últimos anos, tornou-se também uma ferramenta valiosa na biologia, farmacologia, toxicologia, microbiologia, virologia, ciências ambientais e monitorização de bioprocessos. Estudos de viabilidade celular,

conteúdo em DNA nuclear, nível de ploidia, necrose e apoptose celular e análise do ciclo celular são algumas das aplicações mais comuns da FCM nestas áreas (82). O recente êxito da citometria de fluxo baseia-se no equipamento comercialmente disponível, que é ao mesmo tempo robusto e versátil, juntamente com a moderna aquisição de dados e *software* de análise, e o desenvolvimento de vários ensaios de coloração específica (83).

Na citometria de fluxo, células individualizadas ou partículas num fluido são intersestadas por um feixe de laser. A interação das células com o feixe de laser pode ser monitorizada para cada célula individualmente através da análise da sua absorção, dispersão, e/ou a fluorescência. Estes dados podem ser correlacionados com diferentes características de células e componentes celulares. Assim, os dados distribuídos sobre uma população de células podem ser obtidos facilmente (83).

4.2.1. Princípios da citometria de fluxo

Um sistema de citometria de fluxo (Figura 7) é composto por cinco unidades operacionais principais, uma fonte de luz (lâmpada de mercúrio ou laser), câmara de fluxo, unidades óticas de filtragem para a deteção de comprimento de onda específico numa ampla faixa espectral, fotodíodos ou tubos fotomultiplicadores, para deteção sensível dos sinais de interesse, um processador de dados e uma unidade operacional (83).

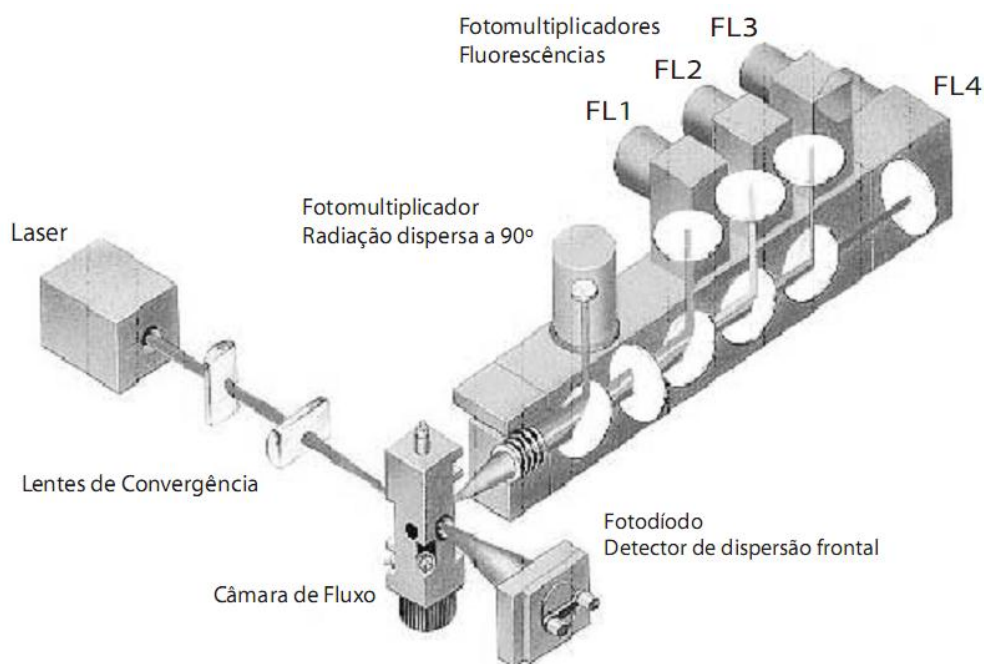


Figura 7: Configuração de um citómetro de fluxo (84).

A suspensão celular é injetada para dentro da câmara de fluxo, onde as células passam individualmente através de um feixe de luz ortogonal ao fluxo. Para tal, a amostra é injetada na corrente no interior da câmara de fluxo. Uma vez que o fluxo do citómetro é mais rápido do que o fluxo da amostra, esta é reduzida na sua área de secção transversal e, portanto, as células são isoladas nesta corrente. Através desta tecnologia, é possível detetar até 10.000 células/s. Ao embater numa célula, a luz dispersa-se em ambas as direções, para a frente e para os lados. A dispersão frontal da luz é proporcional ao tamanho das células e pode ser detetado sem manipulação posterior. A dispersão ortogonal é afetada por vários parâmetros, incluindo a granularidade e complexidade das células. Os compostos intracelulares que possuem uma fluorescência intrínseca, como o NAD(P)H, ou compostos marcados com corantes fluorescentes específicos permitem analisar componentes celulares seletivamente (83). A luz fluorescente resultante é processada através do fotomultiplicador para o sistema de processamento de dados, e os resultados são analisados por um *software* específico. A dispersão da luz e os sinais de fluorescência podem ser combinados de várias formas, permitindo que todas as subpopulações possam ser observadas. Além disso, os citómetros de fluxo designados “*Cell sorter*” permitem separar determinadas subpopulações de interesse. As classificações baseiam-se numa unidade de separação que divide o fluxo de células em pequenas gotas. Antes das gotículas se formarem as células são eletricamente carregadas e as gotículas resultantes são desviadas para um recipiente de recolha pela passagem através de um campo elétrico (83).

A Tabela 2 apresenta alguns parâmetros celulares que podem ser medidos por citometria de fluxo. Embora algumas destas medições possam ser feitas por métodos alternativos, a citometria de fluxo continua a ser o único meio de obter informação sobre o modo como o parâmetro é distribuído na população.

Tabela 2: Características celulares e componentes que podem ser determinados através de citometria de fluxo (adaptado de (83)).

Características celulares	Componentes celulares
Tamanho da célula	DNA
Granularidade do citoplasma	RNA
Forma da célula	Proteína total
Potencial de membrana	Lípidos
pH intracelular	Antigénios
Viabilidade	Atividade enzimática
Autofluorescência	Grupos glucídicos de superfície
Estado redox intracelular	Recetores de superfície
	Cálcio intracelular
	Conteúdo em ergosterol

4.2.2. Ciclo celular

O ciclo de crescimento e divisão das células, seguida de crescimento e divisão das células filhas, é designado por ciclo celular. As células que não estão em crescimento ou envolvidas na divisão celular encontram-se na fase G_0 do ciclo celular. Se a divisão é desencadeada, a célula entra primeiro na fase G_1 , na qual a quantidade de RNA aumenta e se formam algumas proteínas essenciais à replicação do DNA. As células entram na fase S quando iniciam a síntese de novo DNA, que aumenta até ao dobro. Neste momento a síntese de DNA cessa e a célula encontra-se na fase G_2 . Finalmente, a célula entra em mitose (M) e divide-se, voltando à fase G_1 se a divisão celular continuar, ou à fase G_0 . As células nas fases G_2 e M do ciclo celular possuem o dobro da quantidade de DNA das células nas fases G_0 e G_1 , enquanto as células na fase S possuem uma quantidade de DNA entre estes dois extremos (78).

A progressão das células através do ciclo celular é regulada por sinais extracelulares e intracelulares que monitorizam e coordenam os vários processos que ocorrem durante as diferentes fases do ciclo celular. Na maioria das células animais o ciclo celular é regulado na fase G_1 . Em particular, no ponto de restrição da fase G_1 , regulado principalmente por fatores de crescimento. Na presença dos fatores de crescimento apropriados, as células transpõem o ponto de restrição, uma vez passado este ponto a célula está empenhada em prosseguir no ciclo celular. Por outro lado, se os fatores de crescimento adequados não estão disponíveis em G_1 , a progressão do ciclo celular para no ponto de restrição (Figura 8) (78).

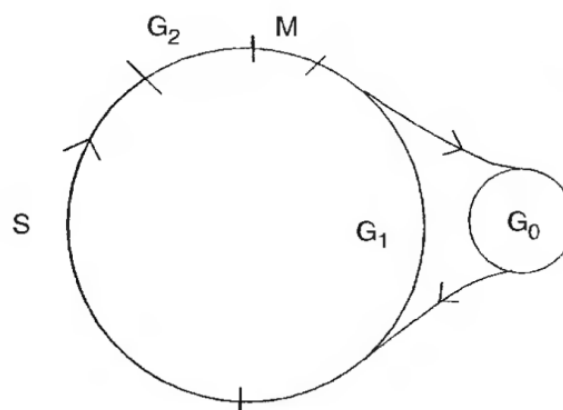


Figura 8: Ciclo celular (78).

A análise do ciclo celular requer a identificação da fase em que as células se encontram. As células mitóticas podem ser distinguidas microscopicamente, no entanto, as células nas outras fases do ciclo (G_1 , S e G_2) devem ser identificadas por critérios bioquímicos. As células em fase S podem ser facilmente identificadas porque incorporam timidina radioativa, que é exclusivamente utilizada na síntese de DNA (78).

As células nas diferentes fases do ciclo celular podem ser distinguidas pelo seu conteúdo em DNA nos diferentes estádios do ciclo celular. Em células cujo número de cromossomas dos gâmetas é designado por haploide (n), o número de cromossomas nas células somáticas é diploide ($2n$). Durante a fase S, a replicação aumenta o conteúdo de DNA da célula de $2n$ para $4n$, então as células S têm conteúdo de DNA que varia entre $2n$ e $4n$, e permanece em $4n$ durante as fases G_2 e M. Eventualmente, algumas células somáticas podem ser tetraploides ($4n$) ou até mesmo octaploides ($8n$). O número de cromossomas num tumor é frequentemente maior que $2n$ (hiperploides) e algumas vezes menor (hipoploides), este número anormal de cromossomas é designado por aneuploidia (78).

Experimentalmente, o conteúdo de DNA celular pode ser determinado por incubação de células com um corante fluorescente que se liga ao DNA, seguida de análise da intensidade de fluorescência de células individuais num citómetro de fluxo e assim, distinguir células nas fases G_1 , S e G_2 /M do ciclo celular (78). A citometria de fluxo tem sido uma técnica muito valiosa em biologia celular, que possibilita a construção de um histograma que representa o número de células *versus* o seu conteúdo em DNA (Figura 9), refletindo assim o estado da cultura (78).

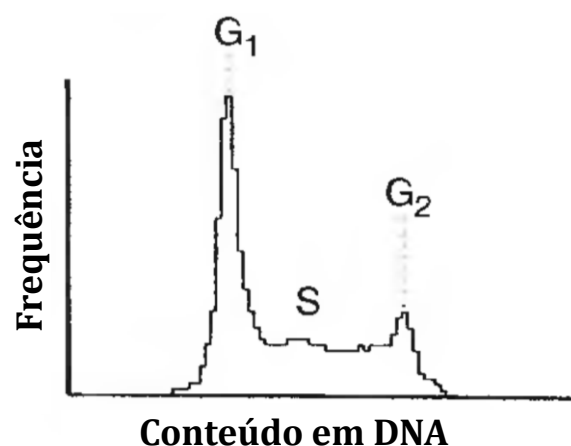


Figura 9: Histograma de DNA de uma cultura celular (adaptado de (78)).

Para uma análise precisa do ciclo celular da cultura através de citometria de fluxo é necessário preparar as células de modo a obter núcleos ou células intactas com o mínimo de degradação do seu DNA. As células devem ser bem fixadas ou permeabilizadas para permitir o acesso do corante ao DNA. Contudo, muitos corantes além de se ligarem ao DNA também se ligam ao RNA de cadeia dupla (dsRNA), sendo necessário removê-lo através de digestão com ribonuclease (RNase). Além disso é necessário verificar a limpeza e esterilização de todo o material e soluções, visto que contaminações com desoxirribonucleases (DNases) podem degradar o DNA nuclear e consequentemente afetar a qualidade da análise (78).

Se dois núcleos ou células na fase G_1 do ciclo celular estão agregadas, no seu conjunto terão a mesma quantidade de DNA que uma única célula em fase G_2 , e as duas devem ser distinguidas se o histograma de DNA pretender refletir o estado do ciclo celular com precisão. A qualidade do histograma é estimada a partir da largura do pico de DNA das células em fase G_1 do ciclo celular, quanto mais estreitos forem os picos, mais precisa é a medição de ploidia e melhor será a estimativa da percentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular (78).

4.3. Análise da genotoxicidade: ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN)

As alterações cromossômicas podem ser uma manifestação e/ou consequência de danos ao nível do DNA por exemplo, rutura de cromossomas que podem resultar da não reparação da cadeia dupla de DNA e rearranjos cromossômicos que podem resultar de falhas na reparação do DNA (85, 86). Por sua vez, a perda ou separação anómala de cromossomas (não disjunção) são eventos importantes no cancro e envelhecimento e, são geralmente causados por defeitos no centrómero ou como uma consequência da estrutura menos condensada dos cromossomas antes da metáfase (86, 87).

Nas técnicas citogenéticas clássicas, os cromossomas são estudados diretamente através da observação e contagem das aberrações na metafase. Esta abordagem fornece uma análise detalhada, mas a complexidade e laboriosidade dos métodos, assim como os artefactos de preparações em metafase têm motivado o desenvolvimento de um sistema mais simples para medir danos cromossômicos. Posteriormente, Schmid (88) e Heddle (89)

propuseram uma abordagem alternativa e mais simples para avaliar os danos cromossômicos *in vivo* através da contagem de micronúcleos (MN).

Os micronúcleos são expressos em células em divisão onde ocorrem ruturas de cromossomas e/ou cromossomas inteiros que não são capazes de migrar para os polos durante a mitose. Na telofase, forma-se um invólucro nuclear em torno dos cromossomas e fragmentos atrasados que assumem gradualmente a morfologia de um núcleo de interfase com a ressalva de que estes são menores do que o núcleo principal na célula, e daí o termo "micronúcleo" (Figura 10). Portanto os micronúcleos fornecem um índice simples e fiável, tanto da rutura de cromossomas como da perda de cromossomas. Uma vez que a formação de micronúcleos ocorre apenas em células que tenham completado a divisão nuclear são idealmente marcados durante a fase binucleada do ciclo celular (90, 91).

O ensaio de micronúcleos com o bloqueio da citocinese (CBMN) já demonstrou ser uma ferramenta eficaz para o estudo da disfunção celular e nuclear causada por testes *in vitro* e *in vivo* de envelhecimento, deficiência ou excesso em micronutrientes, exposição a compostos genotóxicos e defeitos genéticos na manutenção do genoma. Dado que os micronúcleos só poderão formar-se em células eucarióticas em divisão, o teste não pode ser utilizado de forma eficiente ou quantitativamente fiável em populações de células que não se dividam ou em populações de células em divisão, em que a cinética da divisão celular não é bem compreendida nem controlada. Consequentemente, surgiu a necessidade de desenvolver um método que permita distinguir entre as células que não se dividem e células que estão a sofrer mitose dentro de uma população de células. Além disso, devido à incerteza do destino de micronúcleos após mais de uma divisão nuclear, é importante identificar as células que tenham concluído uma divisão nuclear apenas. Vários métodos têm sido propostos com base na citometria de fluxo e abordagens de marcação de DNA, mas o melhor método encontrado devido à sua simplicidade e precisão é o ensaio de micronúcleos com o bloqueio da citocinese (90-92). Neste ensaio, as células que tenham concluído uma divisão nuclear são impedidas de realizar a citocinese porque são expostas a citocalasina-B e, consequentemente, são facilmente identificadas pela sua aparência binucleada (Figura 10).

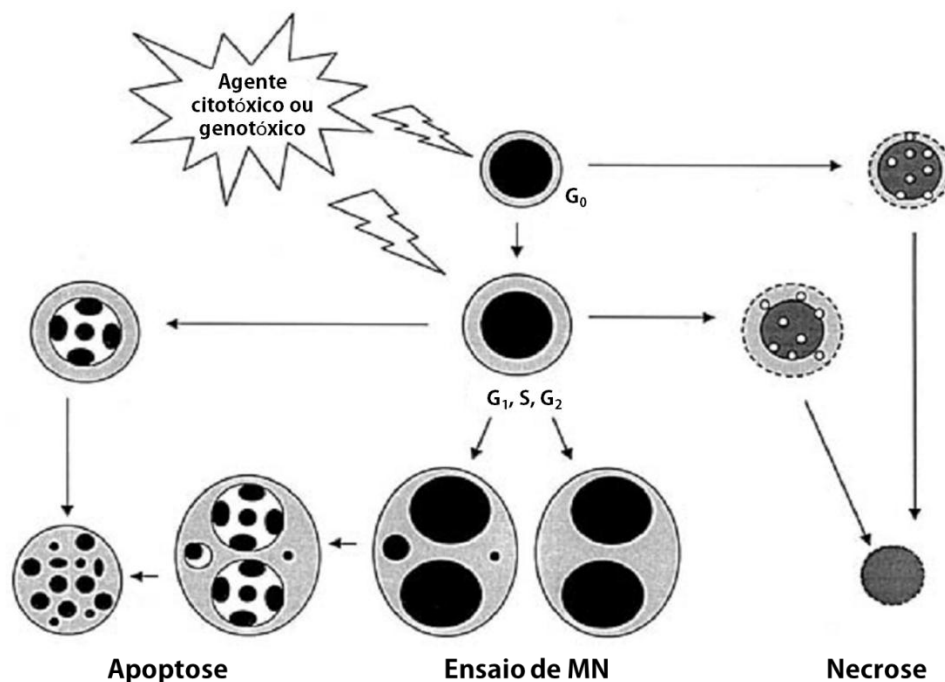


Figura 10: As várias possibilidades das células cultivadas com bloqueio da citocinese depois de expostas a agentes tóxicos (adaptado de (86)).

O composto citocalasina-B é um inibidor da polimerização da actina, a qual participa na formação do anel de microfilamentos que constringe o citoplasma entre os núcleos das células filhas durante a citocinese (92). O uso de citocalasina-B permite a acumulação de praticamente todas as células que se dividem na fase binucleada, independentemente do seu grau de sincronia e a proporção de células em divisão. Os micronúcleos são então contados apenas em células binucleadas, o que permite comparações fiáveis de danos cromossômicos entre populações de células que podem ser diferentes na sua cinética de divisão celular. Mesmo assim é necessário definir critérios para a seleção de células binucleadas, que podem ser contabilizadas para a frequência de micronúcleos (86), entre os quais se destacam:

- Os dois núcleos numa célula binucleada devem ter as membranas nucleares intactas e situar-se dentro do limite do mesmo citoplasma;
- Os dois núcleos numa célula binucleada devem ser aproximadamente iguais em tamanho, coloração e intensidade de coloração;
- Os dois núcleos dentro de uma célula binucleada podem estar ligados por uma ponte nucleoplasmática fina;

- Os dois núcleos principais duma célula binucleada podem tocar-se, mas idealmente não devem sobrepor-se uns aos outros. Uma célula com dois núcleos sobrepostos somente pode ser contabilizada, se os limites de cada um dos núcleos for distinto;
- A membrana plasmática das células binucleadas deve estar intacta e distinguir-se claramente a partir do limite do citoplasma das células adjacentes.

Depois de identificadas as células binucleadas com características que permitam contar micronúcleos é necessário definir então as características que os próprios micronúcleos devem apresentar para poderem ser contabilizados (86), de onde se destacam:

- Os micronúcleos não devem encontrar-se ligados entre si, nem ao núcleo principal;
- Os micronúcleos podem tocar, mas não sobrepor-se aos núcleos principais e o limite micronuclear deve distinguir-se do limite nuclear;
- Geralmente têm a mesma intensidade de coloração que os núcleos principais, mas ocasionalmente podem ter coloração mais intensa.

Em ensaios de genotoxicidade a inclusão da necrose e apoptose é importante para a descrição exata do mecanismo de ação e de medição da sensibilidade celular a um composto. O uso de citocalasina-B facilita a marcação de células apoptóticas, pois espera-se que iniba a desintegração de células apoptóticas em pequenos corpos apoptóticos. O último processo requer montagem de microfilamentos (93), a qual é facilmente inibida pela citocalasina-B. A identificação de células em apoptose e necrose também segue alguns critérios. As células apoptóticas apresentam a cromatina condensada, com fronteiras citoplasmáticas e nucleares intactas ou fragmentação nuclear que forma pequenos corpos nucleares dentro de uma membrana citoplasmática intacta. As células necróticas exibem um citoplasma pálido com vacúolos numerosos e a membrana citoplasmática danificada com um núcleo intacto e perda de citoplasma ou a membrana nuclear danificada e/ou irregular com uma estrutura nuclear parcialmente intacta (94).

II – Objetivos

Para uma administração de fármacos controlada e eficiente é necessário procurar constantemente vias e veículos que satisfaçam estas necessidades. Como já foi referido, a administração transdérmica de fármacos é vantajosa porque além de permitir a distribuição controlada, diminui alguns dos efeitos adversos observados noutras vias. Assim é necessário desenvolver veículos que transportem fármacos de forma eficiente através da pele, como nanopartículas de polissacarídeos, por exemplo, visto que é possível manipular as suas características de forma a obter o perfil de libertação pretendido.

Assim, o objetivo geral deste trabalho é avaliar a toxicidade de um nanogel sintetizado a partir de κ -carragenana tendo em vista a sua potencial aplicação como veículo de fármacos transdérmico. Portanto, pretende-se avaliar a biocompatibilidade do nanogel através da sua exposição em queratinócitos HaCaT, como modelo biológico *in vitro*, analisando diferentes parâmetros biológicos, que permitam concluir acerca de toxicidade do nanogel. Para tal, definiu-se uma metodologia que segue os seguintes objetivos específicos:

- Analisar a viabilidade de queratinócitos HaCaT quando expostos a carragenana em solução e nanogel através de um método rápido e sensível como o ensaio de MTT.
- Analisar as alterações provocadas por κ -carragenana na forma de solução e nanogel no desenvolvimento das culturas de queratinócitos HaCaT através do estudo do ciclo celular por citometria de fluxo.
- Analisar danos ao nível do DNA provocados pela presença de carragenana em solução e nanogel pela formação de micronúcleos através do ensaio de micronúcleos com o bloqueio da citocinese.
- Contribuir para a avaliação da aplicabilidade do nanogel de κ -carragenana como transportador de fármacos.

III – Métodos

1. Preparação de nanoesferas de κ -carragenana pelo método de microemulsão reversa

As nanoesferas de carragenana foram preparadas pelo método de microemulsão reversa combinada com a gelificação termicamente induzida de acordo com Daniel-da-Silva e colaboradores (95).

As microemulsões reversas foram obtidas por sonicação de uma mistura que compreende *n*-heptano (>99%) (Fluka Chemie) como fase orgânica, brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) (>99%) (Fluka Chemie) como surfactante e 1-butanol absoluto (Fluka Chemie) como co-surfactante. A fase aquosa correspondeu à solução de κ -carragenana $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Fluka Chemie), contendo cloreto de potássio $0,1 \text{ M}$ (KCl) (>99%) (Sigma-Aldrich). Adicionaram-se 1,6 g de CTAB a 10 mL de *n*-heptano/1-butanol (77:23 v/v) a 75°C que se homogeneizaram através de sonicação, adicionou-se 1,94 mL da fase aquosa e sonicou-se mais 2 min num processador ultrassónico Cole Parmer. A mistura arrefeceu à temperatura ambiente para induzir a gelificação térmica das nanoesferas. Posteriormente, as nanoesferas foram recolhidas por centrifugação a 300 g. A remoção do CTAB fez-se através de dispersão em banho de ultrassons das partículas em etanol seguida de centrifugação a 300 g, durante 15 min à temperatura ambiente, este processo foi repetido pelo menos 20 vezes, até os espectros de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) revelarem apenas vestígios de CTAB. As nanoesferas foram analisadas por FTIR num espectrómetro Mattson 7000 com 4 cm^{-1} de resolução com as pastilhas de brometo de potássio (KBr). As nanoesferas foram liofilizadas para posterior utilização.

1.1. Caracterização das nanoesferas através da dispersão dinâmica da luz (DLS)

A técnica de dispersão dinâmica da luz (DLS) é utilizada para medir do tamanho de partículas submicrométricas geralmente em meios líquidos e baseia-se na medição do movimento browniano das partículas. Este movimento ocorre quando as moléculas do meio líquido colidem com as partículas em suspensão e por esta razão as partículas de dimensões maiores possuem um movimento mais lento que as menores. É importante ter em conta que a medida adquirida não corresponde às partículas em si nem mesmo aos

agregados, corresponde ao diâmetro hidrodinâmico ($Z_{\text{médio}}$) por elas formado. Este diâmetro corresponde ao de uma esfera que possui o mesmo coeficiente de difusão translacional que a partícula/agregado em si. Este coeficiente é influenciado pela partícula em si, a sua superfície, pela concentração e o tipo de iões do meio (96).

O diâmetro hidrodinâmico médio de nanogéis foi determinado por DLS usando um instrumento Zetasizer Nanoseries de Malvern Instruments. As amostras foram preparadas em solução de tampão fosfato (PBS) a pH de 7,4 e meio “Dulbecco's Modified Eagle Medium” completo (DMEM completo) de forma a poder comparar-se o comportamento destas nanosferas em PBS, já caracterizadas por Daniel-da-Silva e colaboradores (95), e meio de cultura. As medições foram realizadas a 25 °C, todas as amostras foram equilibradas durante pelo menos 3 minutos antes de se realizar a medição. O diâmetro hidrodinâmico médio de nanogéis sob consideração correspondia ao valor de $Z_{\text{médio}}$ medido por DLS.

1.2. Quantificação de CTAB

O CTAB (Figura 11) é utilizado como surfactante na síntese das nanoesferas pelo método da microemulsão reversa descrito anteriormente. No entanto, este composto é tóxico, tornando-se fundamental quantificá-lo nas nanoesferas sintetizadas.

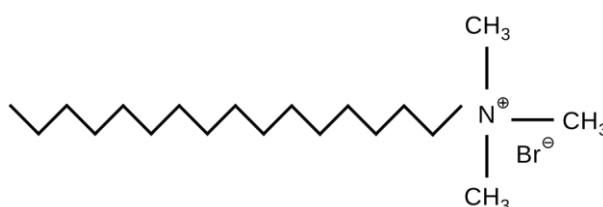


Figura 11: Estrutura química do CTAB.

A quantificação de CTAB foi realizada recorrendo a uma curva de calibração construída com soluções de CTAB, preparadas em água destilada, cujas concentrações variaram entre 0,02 e 0,4 mg·mL⁻¹, de onde se interpolou o valor da concentração de CTAB presente nas nanoesferas.

2. Cultura da linha celular HaCaT

A linha celular HaCaT foi imortalizada por Boukamp (70) e trata-se de uma linha de queratinócitos histologicamente normais da pele um adulto humano.

As células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂, em meio “Dulbecco's Modified Eagle Medium” (DMEM) (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) (Gibco), na presença de 10.000 U·mL⁻¹ de penicilina - estreptomicina (Gibco), 2,5 µg·mL⁻¹ de fungizona (Gibco) e 2 mM de L-glutamina (Gibco). As células foram mantidas em frascos de 75 cm² com 10 mL de meio e subcultivadas de três em três dias, período após o qual atingiam 70-80% de confluência (% da área de ocupação da superfície do frasco disponível para crescimento celular).

2.1. Subcultura da linha celular HaCaT

Considerando que as células HaCaT crescem em monocamada aderente, a sua subcultura envolve a adição de tripsina, uma enzima proteolítica, que quebra as ligações das células ao poliestireno, o revestimento do frasco de cultura. Após a observação inicial das células no microscópio invertido (ampliação 100x) (Leica), para verificar a sua morfologia, confluência e eventuais contaminações com bactérias ou fungos, retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas com 5 mL de uma solução tampão salina de fosfato pH 7,2 (PBS) (Gibco). De seguida, adicionaram-se 5 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético 0,05% (p/v) preparado com PBS e incubou-se durante 5 min a 37 °C. Removeu-se o EDTA e adicionou-se uma solução de tripsina-EDTA 1:1 (0,05% tripsina, 0,025% EDTA) (Lonza) e incubou-se o frasco durante 15 min a 37 °C. Ao fim deste tempo, observou-se novamente o frasco no microscópio para verificar se todas as células estavam em suspensão. O efeito da tripsina foi inibido, adicionando 6 mL de meio de cultura. As células foram ressuspensas com a pipeta invertendo o frasco para a posição vertical e tocando com a ponta da pipeta na superfície do frasco, em seguida e para facilitar a desagregação das células, fez-se passar a suspensão celular por uma seringa. Posteriormente, foi realizada a contagem das células usando uma câmara de contagem ou hemocítmetro e determinou-se a densidade celular da suspensão. Num frasco novo, adicionou-se o volume adequado da suspensão a meio DMEM completo de modo a obter a densidade de 1 x 10⁵ células·mL⁻¹ num volume de 10 mL.

2.2. Congelação de células

Aquando da subcultura, procedeu-se à criopreservação das células. Após a tripsinização e determinação da densidade celular, o volume adequado da suspensão celular foi transferido para um tubo de 15 mL, de modo a obter-se a densidade de $1,5 \times 10^6$ células·mL⁻¹. A suspensão foi centrifugada a 180 g durante 5 min. Removeu-se o sobrenadante, tendo o cuidado de não perturbar o sedimento, e ressuspenderam-se as células em 1 mL de meio de cultura com 10% (v/v) de DMSO. A suspensão foi transferida para uma ampola de criopreservação e colocada num contentor de congelação (Mr Frosty, Nalgene) a 4 °C durante 1 h. No fim deste período, o contentor de congelação foi colocado a -80 °C onde foi mantido durante a noite. No dia seguinte as ampolas foram transferidas para o contentor de azoto líquido.

2.3. Descongelação de células

A ampola com as células foi colocada num banho a 37 °C durante 1 - 2 min até estar praticamente descongelada. Transferiu-se o conteúdo da ampola (gota a gota) para um tubo de 15 mL com 5 mL de meio de cultura e centrifugou-se a solução durante 5 min a 180 g. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 5 mL de meio de cultura. Finalmente, a suspensão foi transferida para um frasco de cultura de 75 cm² com 5 mL de meio, e este foi colocado na incubadora a 37 °C e em atmosfera humidificada com 5% de CO₂.

3. Ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT)

Inicialmente descrito por Mosmann em 1983 (97), este método baseia-se na capacidade de células viáveis para converter um sal de tetrazólio solúvel, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), num precipitado de formazano insolúvel. Os cristais púrpura de formazano podem ser dissolvidos em solventes orgânicos, como dimetilsulfóxido (DMSO), medindo-se a densidade ótica da solução resultante (98).

Plaquearam-se 6000 células/poço num volume de 200 μL em placas de 96 poços e incubaram-se durante 24 h a 37 °C e 5% CO_2 para adesão. Após este período, o meio foi retirado e foi substituído por meio com diferentes concentrações de κ -carragenana (0,1; 0,5 e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), nanoesferas de κ -carragenana (0,1; 0,5 e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e CTAB (0,01-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubaram-se de novo as células durante 6 h, 24 h ou 48 h a 37 °C, 5% CO_2 . Retirou-se este meio que se substituiu por meio e reagente MTT 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em PBS (4:1) e incubou-se durante 4 h a 37 °C, 5% CO_2 , removeu-se o meio de cultura contendo o reagente MTT e adicionou-se igual volume de DMSO e incubou-se de novo no agitador orbital durante 2 h protegido da luz. As absorvâncias de cada poço foram medidas a 570 nm num leitor de microplacas (Synergy™ HT, BioTeK®), tendo sido feita a respetiva correção com a média do branco (DMSO). Todos os ensaios foram realizados com 6 réplicas para cada concentração e o ensaio foi repetido 3 vezes.

A absorvância média obtida para o controlo negativo foi considerada como sendo 100% de crescimento celular, calculando-se a percentagem de crescimento através da fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{A570 \text{ extrato}}{A570 \text{ controlo negativo}} \times 100$$

4. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

O conteúdo de DNA celular foi determinado por incubação de células com um corante fluorescente que se liga ao DNA, seguida de análise da intensidade de fluorescência de células individuais num citómetro de fluxo e assim, distinguir células nas fases G_0/G_1 , S e G_2/M do ciclo celular (78).

Nesta análise, foram plaqueadas, $0,5 \times 10^5$ células· mL^{-1} em placas de 6 poços (2,0 mL/poço). As placas foram incubadas 24 h nas condições de cultura. Após este tempo, o meio foi substituído pelo mesmo volume de meio com κ -carragenana (0,1; 0,5 e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e nanoesferas de κ -carragenana (0,1; 0,5 e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Efetuaram-se 3 réplicas de todas as amostras e controlos. Para cada ensaio foram preparadas placas, cuja análise foi realizada após 6 h, 24 h e 48 h de incubação (37 °C, 5% CO_2). No fim de cada tempo de incubação observaram-se as células num microscópio invertido (ampliação 100x). A seguir, as células foram lavadas com 1 mL de PBS pH 7,2 (Gibco) e incubadas durante 5

min com 360 µL de EDTA, retirou-se o EDTA e as células foram tripsinizadas com 360 µL tripsina/EDTA (Gibco), que foi posteriormente inativada com 500 µL de meio de cultura. As células foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min. Retirou-se o sobrenadante com cuidado, e ressuspendeu-se o sedimento em 400 µL de PBS. Centrifugaram-se de novo as células a 2000 rpm durante 5 min, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 1 mL de etanol 85% frio e guardaram-se os tubos a -20 °C até à análise.

No momento da análise por citometria de fluxo centrifugaram-se as células a 2000 rpm durante 5 min, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 800 µL de PBS, agitou-se no vórtex durante 15 s. As suspensões foram filtradas em filtro de nylon (50 µm de poro) para o tubo FCM, em seguida adicionou-se 50 µg·mL⁻¹ de RNase (Sigma) para eliminar o RNA da amostra e 50 µg·mL⁻¹ do fluorocromo iodeto de propídio (Fluka) para marcar o DNA nuclear. As amostras foram incubadas durante 20 min à temperatura ambiente e mantidas ao abrigo da luz até se proceder à sua análise. A intensidade da fluorescência relativa (FL) dos núcleos marcados com iodeto de propídio foi medida num citómetro de fluxo Beckman-Coulter EPICS-XL (Beckman-Coulter®).

5. Ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN)

O ensaio de CBMN baseia-se na análise de micronúcleos em células binucleadas, isto é, em células nas quais foi bloqueada a citocinese através da exposição das células à citocalasina-B (86), permitindo assim calcular-se o Índice de Divisão Nuclear (NDI) foi calculado de acordo com o método de Eastmond e Tucker (99). Quinhentas células são marcadas para determinar a frequência de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos e calcular o NDI utilizando a fórmula:

$$NDI = \frac{M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4}{N}$$

onde M1-M4 representam o número de células com 1-4 núcleos e N é o número total de células viáveis marcadas. O NDI e a proporção de células binucleadas são parâmetros úteis para comparar a resposta mitogénica das células e os efeitos citostáticos dos compostos testados no ensaio (86).

A avaliação mais precisa do estado da cultura é obtida se as células em necrose e apoptose forem incluídas no número total de células marcadas porque às altas doses tóxicas de substâncias químicas testadas espera-se que uma proporção elevada de células se tornem não-viáveis (86). O cálculo da percentagem de necrose e apoptose oferece uma indicação do estado das células quanto ao nível de genotoxicidade da material ao qual estão expostas, visto que inclui na contagem o número de células não-viáveis.

No ensaio de micronúcleos começou-se por semear as células em placas de 6 poços que continham uma lamela em cada poço e incubou-se durante 24 h a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ para adesão. As células foram expostas a κ -carragenana (0,1; 0,5 e 1 mg·mL⁻¹) e nanogel de κ -carragenana (0,1; 0,5 e 1 mg·mL⁻¹) e incubaram-se as células nas mesmas condições durante 24 h. Retirou-se o meio de exposição das células e adicionou-se citocalasina-B (Applichem) 4,5 μ g·mL⁻¹ preparada em meio de cultura e incubou-se por mais 29 h nas condições anteriores. Fixaram-se as células com metanol absoluto a 4 °C. A análise dos núcleos fez-se com a marcação dos núcleos com laranja de acridina, o meio de montagem foi água destilada.

A análise de lâminas foi realizada com ampliação de 400 \times utilizando um microscópio de fluorescência (Nikon eclipse 80i). Os micronúcleos foram contados em pelo menos 1000 células binucleadas. A contagem foi realizada também para calcular a fração de células mononucleadas, binucleadas, e tri-/tetra-nucleadas por 500 células contabilizadas, assim como o número de células mortas ou a morrer devido à apoptose ou necrose para cada condição de acordo com os critérios estabelecidos por Fenech (86).

6. Análise estatística

Todos os ensaios foram o resultado de pelo menos três experiências independentes. Em cada parâmetro, usou-se o programa GraphPad Prism® para comparação entre as várias condições estudadas. Para os ensaios de MTT e citometria de fluxo foi utilizada ANOVA One Way seguida pelo teste de Tuckey, enquanto que para o DLS e o ensaio de micronúcleos foi utilizado o teste t-student para. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

IV – Resultados

1.1 Caracterização das nanoesferas de κ -carragenana

1.1. Monitorização da remoção de CTAB por FTIR

A caracterização e análise da toxicidade das nanoesferas foram realizadas depois da remoção do CTAB através de vários ciclos de extração com etanol puro e banhos de ultrassons. A extensão da remoção do CTAB foi monitorizada através de FTIR. O CTAB apresenta picos típicos na gama de 1490-1360 e 980-900 cm^{-1} (50). Após 20 ciclos de extração por solvente, o espectro de FTIR das partículas finais (B) revelou remoção substancial do surfactante (Figura 12).

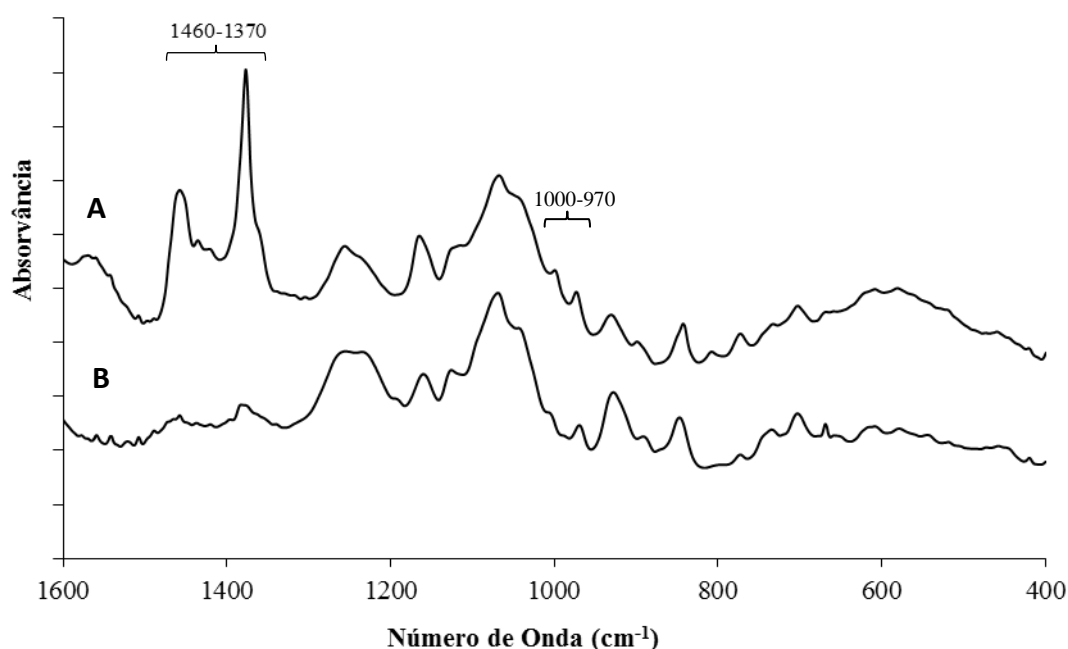


Figura 12: Espectros de FTIR de nonogel de κ -carragenana após (A) 10 e (B) 20 ciclos de extração com o solvente para a remoção do CTAB.

1.2. Análise do diâmetro hidrodinâmico por DLS

O diâmetro hidrodinâmico médio ($Z_{\text{médio}}$) corresponde ao diâmetro médio das partículas em solução, este parâmetro influencia a capacidade de carga e distribuição de compostos. Desta forma pode determinar-se o tamanho das partículas aquando da exposição. As nanoesferas não apresentaram diferenças significativas de $Z_{\text{médio}}$ em meio,

quando comparadas com o controle (PBS), para o qual estas partículas já tinham sido caracterizadas anteriormente (Figura 13) (49).

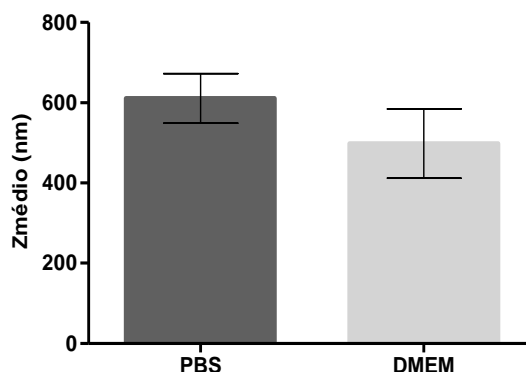


Figura 13: Diâmetro hidrodinâmico ($Z_{\text{médio}}$) das nanoesferas de carragenana em PBS e DMEM. Os valores os valores apresentam média \pm desvio padrão.

1.3. Quantificação do CTAB

Como já foi referido anteriormente o CTAB é utilizado como surfactante na síntese de nanoesferas de carragenana. Contudo, o CTAB é um composto tóxico e como não foi removido na totalidade foi necessário quantificá-lo. A concentração de CTAB nas nanoesferas de carragenana utilizadas neste ensaio foi de $40,01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O que significa que as células foram expostas a aproximadamente 4, 20 e $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CTAB para as concentrações de 0,1; 0,5 e $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanoesferas, respetivamente.

2. Avaliação da citotoxicidade da carragenana e do nanogel de carragenana

Como foi descrito anteriormente, o efeito da carragenana e do nanogel de carragenana no crescimento das células HaCaT foi avaliado através do ensaio de MTT, no qual é originado um produto de cor púrpura que é quantificado através medição da absorvância a 570 nm, e cujo valor é diretamente proporcional ao número de células viáveis e permite, conseqüentemente, fazer uma avaliação da proliferação celular através do cálculo da percentagem de viabilidade celular. Na Figura 14 estão representados os

valores da percentagem de viabilidade celular obtidos após a exposição das células HaCaT a carragenana e nanogel.

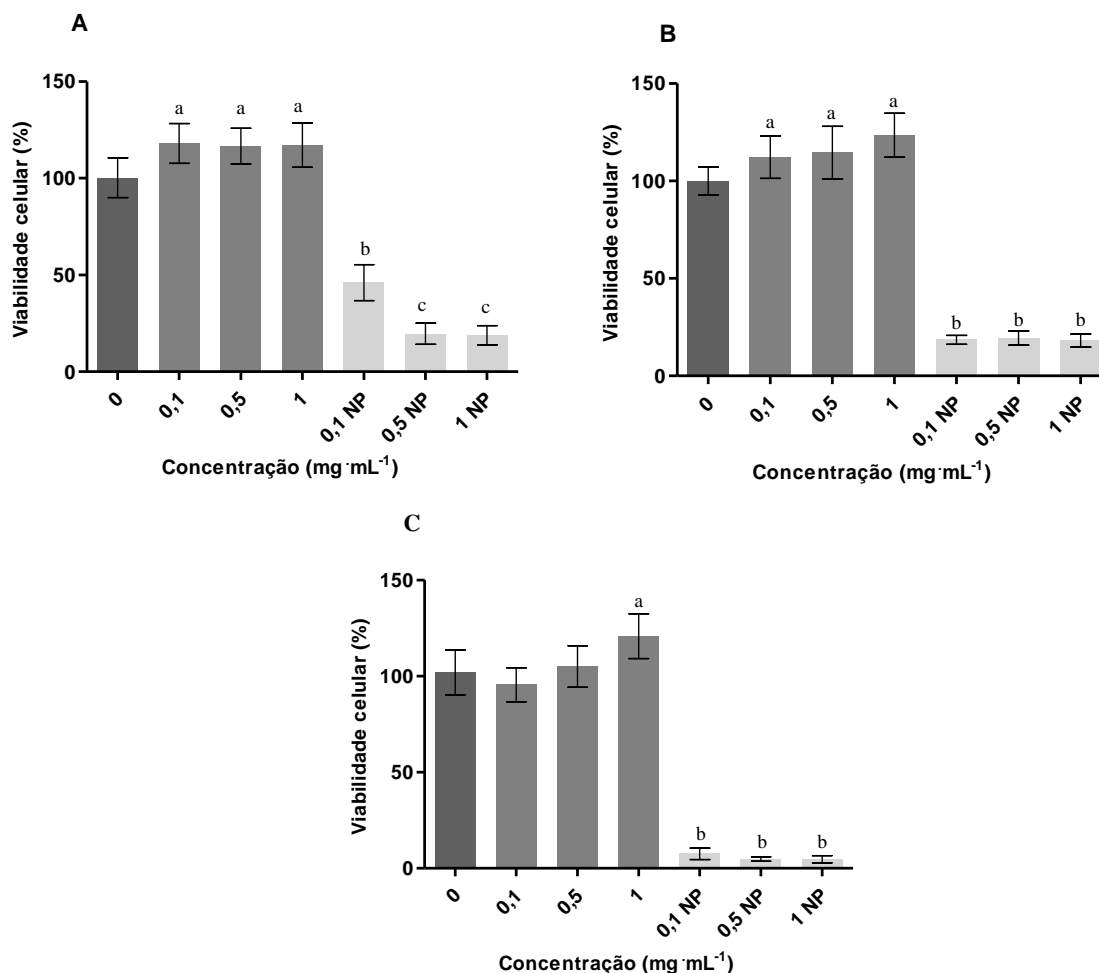


Figura 14: Viabilidade celular (%) para exposições a carragenana. Efeito das diferentes concentrações de κ -carragenana e nanogel (NP) para (A) 6 h, (B) 24 h e (C) 48 h de exposição. Os valores apresentam média \pm desvio padrão. As letras a, b e c indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

Para os diferentes tempos de incubação ocorreram diferenças altamente significativas ($p < 0,001$) entre as amostras. A carragenana livre, aumentou a percentagem de viabilidade celular, exceto para a exposição de 48 h, o que de acordo com o princípio do ensaio de MTT reflete um aumento da atividade metabólica mitocondrial das células. No entanto, para o nanogel de carragenana o ensaio de MTT evidenciou um decréscimo muito acentuado do metabolismo da enzima mitocondrial succinato desidrogenase que por

consequência reflete a diminuição da percentagem de viabilidade celular. Como podemos observar na Figura 14 as nanopartículas de carragenana apresentaram elevada toxicidade para a linha celular HaCaT e além disso os efeitos tóxicos aumentaram para tempos de exposição mais prolongados, como é o caso de 48 h (C). A percentagem de viabilidade celular observada para as exposições a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanogel diminuíram de 40 para 18 e 7%, em relação ao controlo, para 6 h, 24 h e 48 h respetivamente (Figura 14). As concentrações de $0,5$ e $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram mais letais e a viabilidade diminuiu para 20% logo às 6 h e 24 h e ficou abaixo dos 10% para 48 h ($p < 0,001$).

3. Avaliação da citotoxicidade do CTAB

Foi também realizada a análise do efeito do CTAB na percentagem de viabilidade das células HaCaT através do ensaio de MTT (Figura 15).

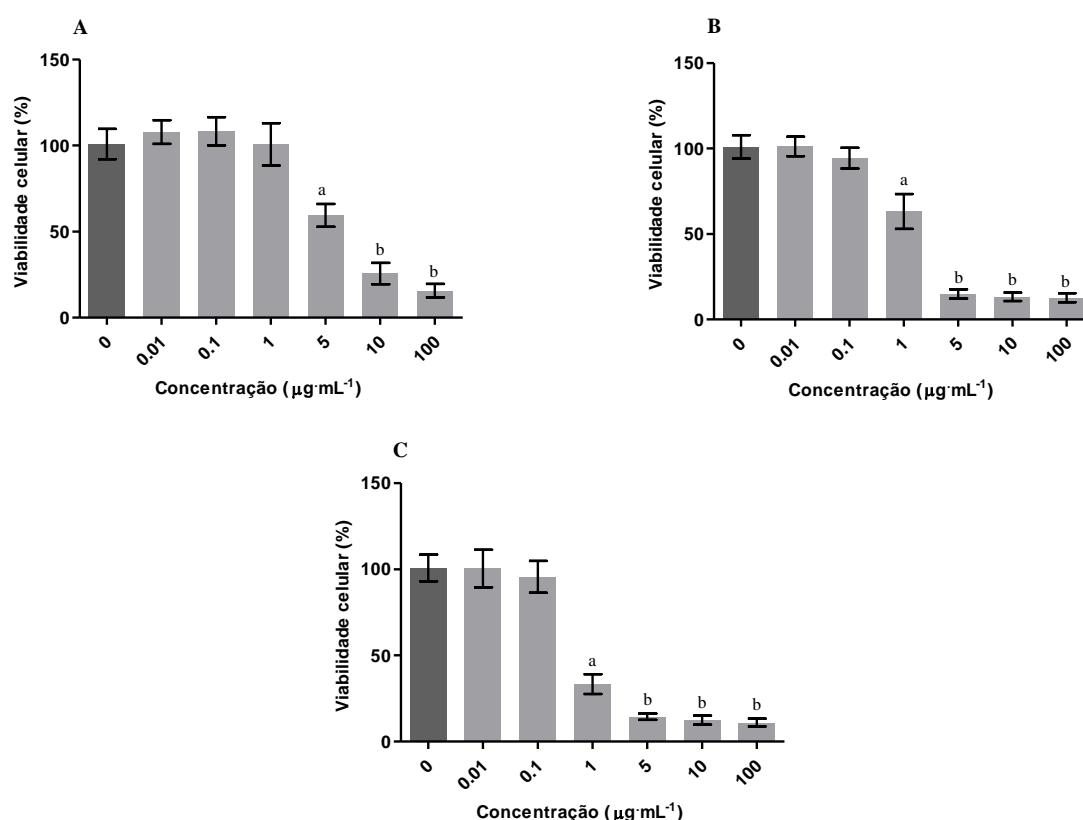


Figura 15: Viabilidade celular (%) para exposições a CTAB. Efeito das diferentes concentrações CTAB para (A) 6 h, (B) 24 h e (C) 48 h de exposição. Os valores os valores apresentam média \pm desvio padrão. As letras a, b e c indicam diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,001$).

Para os diferentes tempos de incubação observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre diferentes concentrações de CTAB. A concentração de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e inferiores não foram tóxicas para as HaCaT, visto que não ocorreu diminuição da viabilidade para qualquer dos tempos de exposição. No caso da exposição efetuada durante 6 h (A), apenas se observou um decréscimo da viabilidade celular a partir da concentração de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (60% em relação ao controlo) que é ainda mais evidente para as concentrações de 10 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (25 e 15% respetivamente). Com o aumento do tempo de exposição ocorreu um aumento da toxicidade do CTAB, visto que as células estão mais tempo expostas ao agente tóxico. Como se observou em B, para 24 h de exposição a concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ já provocou uma diminuição da viabilidade celular para apenas 63%, facto que se acentuou para concentrações mais elevadas, o mesmo se verifica para 48 h (C) de exposição, mas com variações mais significativas de toxicidade.

4. Avaliação dos efeitos da carragenana e do nanogel no ciclo celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para a análise das culturas nas diferentes fases do ciclo celular. Como foi anteriormente descrito foi utilizado o iodeto de propídio como fluocromo, que emite fluorescência na zona do vermelho-laranja, e a análise foi realizada após as 6h e 24h de exposição celular a carragenana e nanogel de carragenana. Os resultados foram previamente analisados para eliminar os sinais de fluorescência correspondentes a núcleos agregados, ou outros artefactos que poderiam condicionar a análise dos resultados.

Na Figura 16 são apresentados alguns exemplos de histogramas obtidos na análise por citometria de fluxo do ciclo celular das células HaCaT cultivadas em meio de cultura. Os histogramas apresentaram um perfil bem definido, com um pico principal correspondente aos núcleos na fase G_0/G_1 com um conteúdo $2n$ em DNA e um segundo pico com o dobro da intensidade de fluorescência, correspondente aos núcleos que se encontram na fase G_2 do ciclo celular e que possuem um conteúdo $4n$ em DNA. Os núcleos que emitem uma fluorescência entre os dois picos têm uma quantidade intermédia de DNA e representam os núcleos na fase S do ciclo celular.

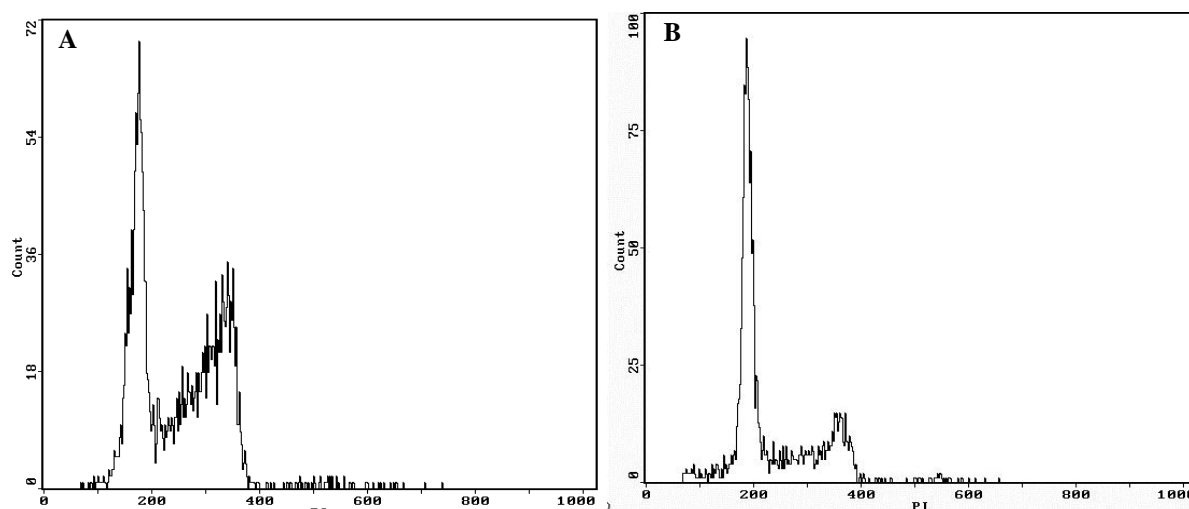


Figura 16: Exemplos de histogramas da intensidade da fluorescência relativa do PI obtidos após análise por citometria de fluxo de núcleos isolados das células HaCaT cultivadas em meio de cultura (controle negativo) às (A) 6 h, (B) 24 h de exposição.

Na Figura 17 apresenta-se a percentagem da população de cada amostra exposta a diferentes concentrações de carragenana e nanopartículas para 6 h (A) e 24 h (B). Para 6 h de exposição ao nanogel verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da percentagem de células em G_0/G_1 (Figura 17 A), acompanhado de um decréscimo significativo da percentagem de células em G_2/M . Por outro lado, para a exposição de 24 h ocorreram, mais uma vez variações mais acentuadas entre o controlo/carragenana vs NP. Para este tempo de exposição verificou-se globalmente uma paragem do ciclo celular em G_2 e S, ocorrendo uma diminuição da percentagem de células que se encontraram na fase G_1/G_0 .

Através da citometria de fluxo não se observaram alterações para as células expostas a carragenana independentemente do tempo de exposição. Pelo contrário, o nanogel sintetizado com a carragenana provocou a paragem do ciclo celular em G_1/G_0 para 6 h de exposição e em G_2/M para 24 h de exposição.

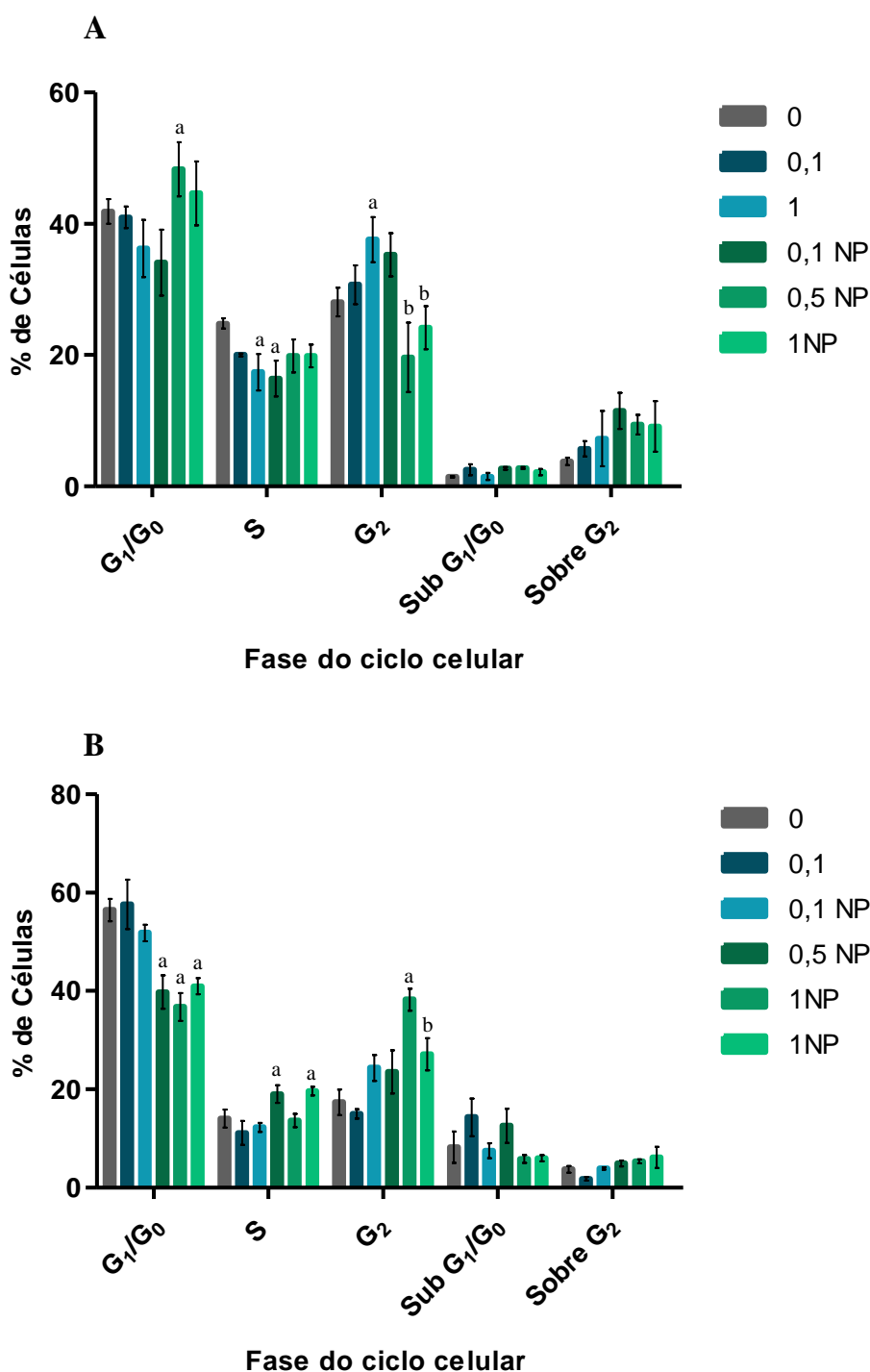


Figura 17: Distribuição de células expostas a carragenana de acordo com as fases do ciclo celular. As células controle e expostas (0,1 e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de carragenana e 0,1; 0,5 e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanogel (NP)) após (A) 6 h e (B) 24 h de exposição. Os valores representam a média \pm desvio padrão. As letras a e b indicam diferenças significativas $p < 0,05$ em cada fase do ciclo celular para cada tempo de exposição.

5. Avaliação da genotoxicidade de carragenana e nanogel através do ensaio de micronúcleos com o bloqueio da citocinese

Os micronúcleos são expressos em células em divisão nas quais partes de cromossomas e/ou cromossomas inteiros não foram capazes de migrar para os polos do fuso durante a mitose. Durante a telófase forma-se um invólucro nuclear em torno dos cromossomas atrasados e/ou fragmentos, que se desenrolam e assumem gradualmente a morfologia de um núcleo de interfase com a particularidade de serem menores que o núcleo principal na célula, daí o termo "micronúcleo". Portanto, os micronúcleos fornecem um índice vantajoso e fiável da rutura e/ou perda de cromossomas. Na Figura 18 são apresentadas imagens representativas do controlo negativo (A) e das células expostas (B a E) ao nanogel obtidas por microscopia de fluorescência para o ensaio de micronúcleos. Para o controlo (A), pode observar-se a morfologia das células HaCaT normais, onde grande parte das células se apresenta binucleada (núcleos aparecem corados a verde e o citoplasma a laranja). As células expostas a $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de carragenana (B) apresentam morfologia semelhante, com elevada incidência de células binucleadas, nas quais se contam os micronúcleos. Para as células expostas às concentrações de nanogel de 0,1; 0,5 e $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, não se observaram células binucleadas, o que resultou num NDI igual a 1. A ausência de células binucleadas inviabilizou a contagem de micronúcleos para estas condições. Além disso, observaram-se muitas células necróticas, o que indica a elevada toxicidade do nanogel para as diferentes concentrações.

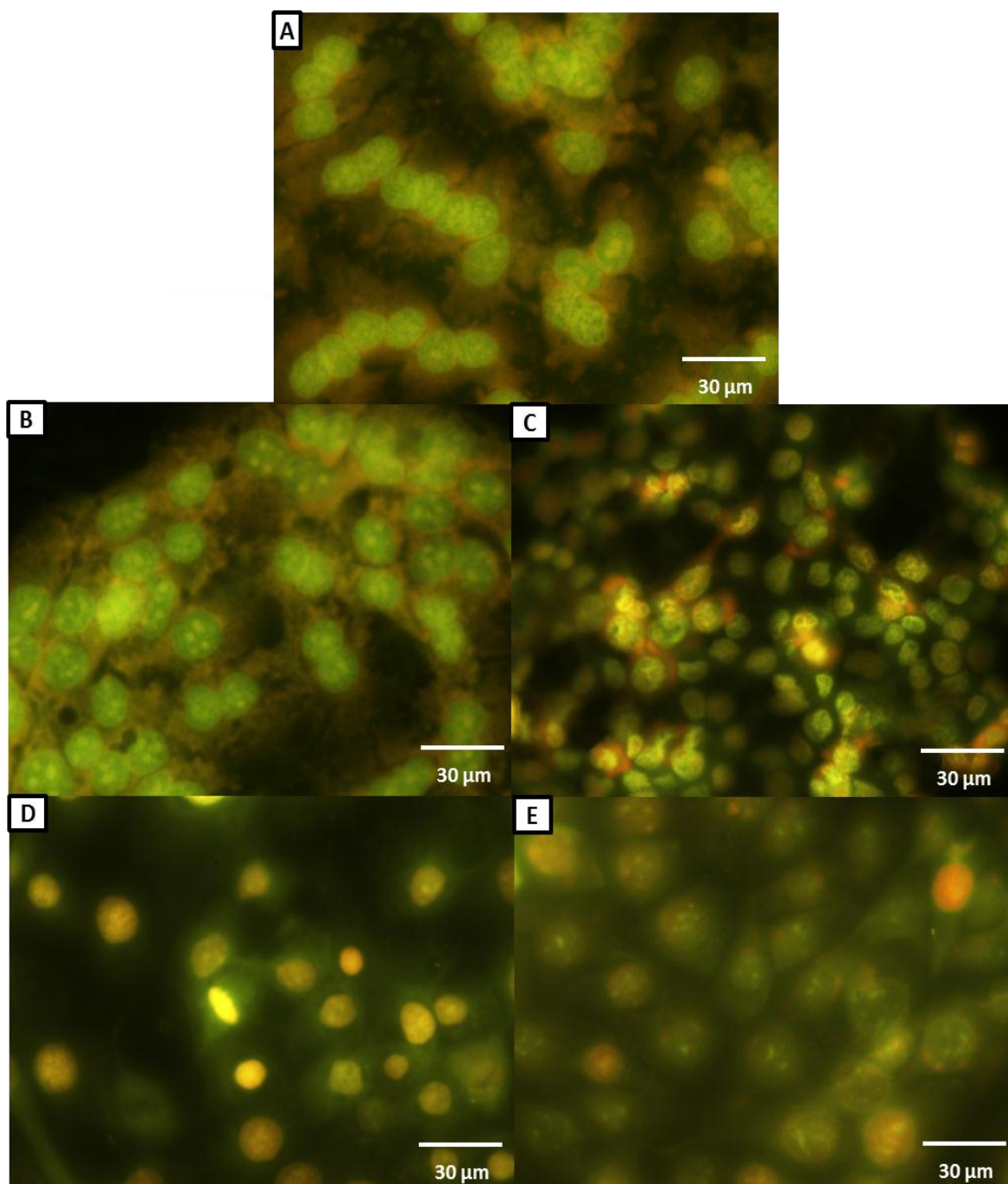


Figura 18: Imagens de microcopia de fluorescência (ampliação 400×) para (A) células controle expostas 6 h a (B) $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de carragenana, (C-E) $0,1$; $0,5$ e $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de nanogel. Todas as amostras foram coradas com laranja de acridina.

As amostras controlo e $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de carragenana apresentaram elevada frequência de células binucleadas, o que possibilitou a contagem de micronúcleos e o cálculo de percentagens de células apoptóticas e necróticas. Para os parâmetros estudados entre as duas amostras não se observaram diferenças significativas (Figura 19). O NDI estimado em 1,7 (A) indica que as células se encontravam em divisão. Além disso, as baixas percentagens em micronúcleos (B), apoptose e necrose (C), sem diferenças significativas entre o controlo e as células expostas a carragenana indicaram que esta não é genotóxica para estas células, visto que mesmo as células não expostas apresentaram uma percentagem basal nestes parâmetros.

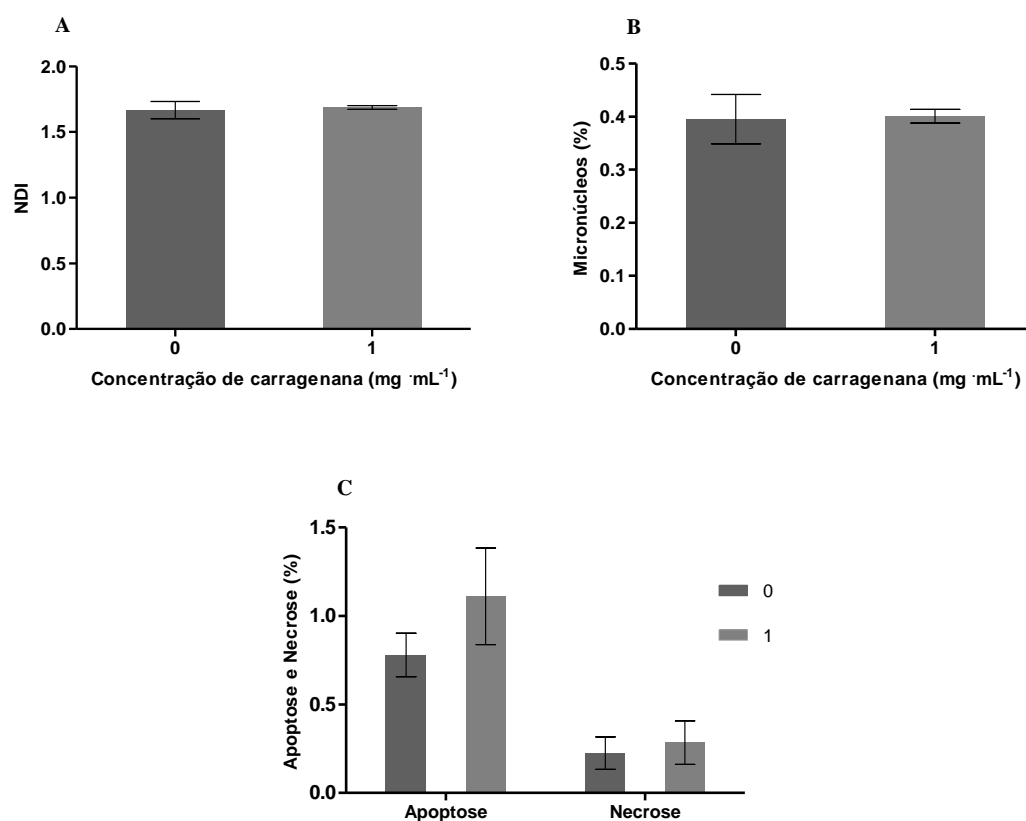


Figura 19: Resultados do ensaio de CBMN (A) NDI, (B) percentagem de micronúcleos, (C) percentagem de apoptose e necrose para o controlo e $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de κ -carragenana após 6 h de exposição. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

V – Discussão

Atualmente, os avanços da indústria farmacêutica requerem métodos que promovam uma maior eficiência de transporte e distribuição dos fármacos para atingirem o seu alvo. Neste contexto, têm sido desenvolvidos novos veículos, entre os quais nanopartículas, que promovem um transporte e perfil de libertação de fármacos mais eficaz. Recentemente, as nanopartículas têm-se destacado devido à possibilidade de manipulação da sua síntese de forma a obter partículas com as propriedades desejadas para aplicações específicas. A síntese de nanopartículas com base em polissacarídeos, nomeadamente a carragenana, tem vindo a ganhar terreno nesta área, visto que tais polissacarídeos produzem nanogéis com propriedades ajustáveis durante a síntese, possuem grande capacidade de carga de fármacos e para além disso não são tóxicos.

Neste trabalho pretendeu-se estudar a possível utilização de um nanogel de carragenana como veículo de transporte de fármacos. Para tal, selecionaram-se várias concentrações de nanoesferas para testar em queratinócitos que permitissem a sua utilização como veículo, tal como outros autores fizeram empregando outro tipos de nanopartículas ou nanogéis (8, 100, 101).

A síntese das nanoesferas de κ -carragenana pelo método de microemulsão reversa implicou a utilização de CTAB como surfactante e a sua posterior remoção foi um passo fundamental na preparação destas nanoesferas. Isto deve-se ao facto de o CTAB ser um composto que altera as propriedades e influencia a própria toxicidade das nanoesferas quando está presente em concentrações elevadas. Através da análise por FTIR das nanoesferas foi possível observar uma diminuição considerável de CTAB presente nas nanoesferas após 20 ciclos de extração com etanol.

Nos resultados de caracterização das nanoesferas verificou-se que estas apresentaram diâmetros hidrodinâmicos idênticos em meio de cultura (DMEM) e em PBS, tal como descrito anteriormente por Daniel-da-Silva e colaboradores (49). Esta semelhança de diâmetros indica que as nanoesferas têm a mesma capacidade de carga e eficiência de encapsulamento, o que viabiliza o estudo destas nanoesferas em meio de cultura partindo do princípio que apresentam características semelhantes às descritas.

A avaliação da biocompatibilidade de possíveis veículos de transporte de fármacos requer estudos *in vivo* e *in vitro*, sendo que os estudos *in vitro* se realizam numa fase inicial do processo e apenas quando se verifica a biocompatibilidade se avança para os estudos *in vivo*. Além disso, nos ensaios *in vitro* é possível avaliar de forma reprodutível, controlada e

num curto espaço de tempo a resposta celular. As células HaCaT têm-se revelado um bom modelo *in vitro* de células de pele, via através da qual se pretende empregar estas nanoesferas como veículo. A biocompatibilidade de um composto ou material é um parâmetro que deve ser exaustivamente estudado antes de este poder ser colocado em contacto com o organismo. Neste trabalho, foi avaliada a toxicidade *in vitro* de carragenana e nanoesferas sintetizadas a partir de carragenana e determinou-se qual o seu efeito na viabilidade celular pelo ensaio de MTT, analisou-se o ciclo celular através de FCM e a genotoxicidade recorrendo ao ensaio de CBMN.

Os resultados do ensaio de MTT revelam que ocorreu um aumento da viabilidade nas células expostas a carragenana para os vários tempos de exposição. Estes resultados vão de encontro a outros estudos realizados anteriormente que afirmam o efeito protetor da carragenana (102) e a sua biocompatibilidade *in vitro* (103, 104) e *in vivo* (105, 106). Neste contexto seria de esperar que o nanogel sintetizado a partir da carragenana também não fosse citotóxico. No entanto, quando as células foram expostas a nanoesferas de carragenana sofreram um decréscimo acentuado da percentagem de viabilidade para todos os tempos de exposição. A viabilidade celular diminuiu gradualmente com a concentração e aumento de tempo de exposição de 6 h para 24 h e 48 h. Excluindo um eventual efeito específico das nanopartículas utilizadas, e dada a reconhecida citotoxicidade do CTAB, estes resultados sugerem que a toxicidade das nanoesferas se deva a algum dos compostos utilizados na sua síntese.

O CTAB, utilizado na síntese das nanoesferas, é um composto tóxico que apesar das sucessivas lavagens não é possível remover completamente e a sua remoção completa poderia até comprometer a estabilidade da forma das nanoesferas. Nos resultados de MTT com as exposições ao CTAB observou-se uma diminuição da percentagem de viabilidade celular que se acentua com o aumento da concentração e do tempo de exposição, tal como se previa e de acordo com estudos anteriormente realizados (107, 108).

Assim foi necessário quantificar a concentração residual de CTAB nas nanoesferas, para verificar se este composto poderia interferir no decréscimo de viabilidade observado para as nanoesferas. Esta quantificação revelou que as nanoesferas apresentam uma quantidade residual de CTAB capaz de interferir na viabilidade celular.

Como já foi referido, o ensaio de MTT foi realizado para diferentes tempos de exposição 6 h, 24 h e 48 h. Os resultados obtidos são consistentes, isto é, os perfis de

viabilidade celular são semelhantes, apesar de ocorrer um decréscimo mais acentuado para tempos de exposição mais prolongados. Assim, o ensaio de MTT foi utilizado como um estudo preliminar da toxicidade das nanoesferas que permitiu selecionar os tempos de 6 h e 24 h para avaliar os efeitos sobre o ciclo celular e 6 h para a contagem de micronúcleos, visto que este é um ensaio muito sensível e não permite a análise quantitativa dos resultados para ensaios onde se verifique elevada citotoxicidade. Foi também com base no ensaio de MTT que foi selecionada a concentração de carragenana de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ como sendo representativa para a análise do ciclo celular e ensaio de micronúcleos, visto que a viabilidade celular foi idêntica para as três concentrações e que, se algum efeito tóxico adviesse da carragenana seria mais visível em exposições com esta concentração.

Na análise do ciclo celular por FCM, as células expostas a carragenana não sofreram alterações no seu ciclo celular tanto para 6 h como para 24 h em relação ao controlo. Em qualquer dos casos as percentagens de células que se encontraram na fase G_0/G_1 foram superiores, seguidas das fases G_2/M e S , apresentando assim as células um comportamento normal de acordo com a literatura (109-111). No entanto, para as células expostas a nanoesferas, principalmente nas concentrações mais elevadas ($0,5$ e $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) observaram-se alterações do ciclo celular. As células expostas durante 6 h a nanoesferas apresentaram maior percentagem de células na fase G_0/G_1 o que indica paragem de divisão das células quando expostas ao nanogel. Por outro lado, nas células expostas durante 24 h às nanoesferas, ocorreu um decréscimo da percentagem de células na fase G_1/G_0 para todas as concentrações de nanoesferas em relação ao controlo, e um aumento das células nas fases S e G_2/M . Estes resultados indicam que as nanoesferas promoveram a paragem do ciclo celular dos queratinócitos, interferindo com o seu desenvolvimento normal.

Através do ensaio de micronúcleos com o bloqueio da citocinese observou-se a toxicidade do nanogel para as células HaCaT após 6 h de exposição. Este ensaio é muito sensível e depende da viabilidade das células, visto que os micronúcleos são contabilizados em células em divisão, assim não foi possível realizar ensaios mais prolongados, visto que seriam agravados os efeitos nocivos para as células, impossibilitando a análise. As células expostas a carragenana não apresentam diferenças significativas em relação ao controlo, nem ao nível do aspeto morfológico, nem do NDI, nem da formação de micronúcleos, ou nas percentagens de apoptose e necrose. Os resultados observados para o controlo ($0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) são consistentes com outros estudos realizados com esta linha celular (112, 113).

As células expostas à carragenana apresentam o mesmo perfil de resultados, o que sugere mais uma vez que a carragenana não é genotóxica para estas células na concentração testada. No entanto, as células expostas a nanoesferas não se dividiram e apresentaram o aspeto característico de necrose, o que indica que os queratinócitos não estavam em divisão porque haviam morrido. Além disso em nenhuma das exposições a nanoesferas existem células binucleadas, sendo o NDI de 1.

Pela análise dos resultados obtidos através das várias técnicas observou-se que a carragenana exibe resultados semelhantes ao controlo, o que significa que não apresenta toxicidade para os queratinócitos que possa ser identificada pelas técnicas utilizadas. No caso das nanoesferas de carragenana observou-se uma consistência dos resultados no sentido da sua toxicidade, visto que diminuíram a percentagem de viabilidade celular analisada através do ensaio de MTT, provocaram a paragem do ciclo celular analisado por citometria, resultados estes que vão ao encontro dos obtidos através do ensaio de micronúcleos, onde foi possível observar que as células não se dividiram e além disso tinham um aspeto necrótico.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as nanoesferas de carragenana apresentam elevada toxicidade para os queratinócitos, mas que esta toxicidade não advém da própria carragenana. Uma das possíveis causas da toxicidade da carragenana pode ter sido a quantidade residual de CTAB presente nas nanoesferas, que se enquadra na gama em que este composto é tóxico para os queratinócitos, como foi referido anteriormente. No entanto, outros mecanismos de toxicidade podem estar por trás da toxicidade destas nanoesferas.

VI – Conclusão

Este trabalho tinha como objetivo testar a biocompatibilidade das nanoesferas de κ -carragenana em queratinócitos (*in vitro*) com o propósito de eventualmente avançar com estudos *in vivo* onde se testariam as suas propriedades como transportador de fármacos através da pele.

Os resultados obtidos para as exposições dos queratinócitos a todas as concentrações de nanoesferas, que correspondem a concentrações que teriam interesse para a sua função de veículo de transporte de fármacos, apresentaram toxicidade. Enquanto a carragenana, que também foi testada nas mesmas concentrações não exibiu quaisquer sinais de toxicidade.

O ensaio de MTT apesar de ser um método destrutivo, no qual a viabilidade das células pode ser analisada apenas no final do ensaio, é um método eficaz e preciso para determinar a percentagem de viabilidade celular e, revelou a diminuição acentuada da viabilidade para as exposições às nanoesferas. Quanto à análise do ciclo celular por citometria de fluxo observou-se a paragem do ciclo celular. Os resultados obtidos através do ensaio de CBMN também revelam a paragem do ciclo celular promovida pela exposição das células ao nanogel. Além disso, este ensaio mostrou claramente que as células apresentavam um aspeto necrótico, sinal da genotoxicidade do nanogel.

Em suma, todos os resultados indicam que apesar de a carragenana ser biocompatível, estas nanoesferas apresentam vários sinais de toxicidade para os queratinócitos. Por outro lado, os resultados obtidos para o CTAB, cuja concentração residual presente nas nanoesferas se enquadra dentro dos seus limites de toxicidade, sugerem que este composto pode ser um dos responsáveis por esta toxicidade. No entanto poder-se-iam realizar estudos complementares como o ensaio de cometas, por exemplo, utilizado para medir ruturas ao nível das cadeias de DNA, ou a análise metabonómica destas células para tentar esclarecer o mecanismo desta toxicidade.

VII – Referências Bibliográficas

1. Singh S, Gajra B, Rawat M, Muthu MS. Enhanced Transdermal Delivery of Ketoprofen from Bioadhesive Gels. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;22(2):193-198.
2. Garcia-Gonzalez CA, Alnaief M, Smirnova I. Polysaccharide-based aerogels- Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*. 2011;86(4):1425-1438.
3. Bertrand N, Leroux JC. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomophysiological perspective. 2011. Epub 2011/10/18.
4. Shin SC, Cho CW, Oh IJ. Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the poloxamer gel in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;193(2):213-218.
5. Takahashi A, Suzuki S, Kawasaki N, Kubo W, Miyazaki S, Loebenberg R, Bachynsky J, Attwood D. Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from in situ gelling xyloglucan formulations in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;246(1-2):179-186.
6. Beneke CE, Viljoen AM, Hamman JH. Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. *Molecules*. 2009;14(7):2602-2620. Epub 2009/07/28.
7. Maeda H, Sawa T, Konno T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *Journal of Controlled Release*. 2001;74(1-3):47-61.
8. Hoare T, Young S, Lawlor MW, Kohane DS. Thermoresponsive nanogels for prolonged duration local anesthesia. *Acta Biomaterialia*. 2012;8(10):3596-3605.
9. Chacko RT, Ventura J, Zhuang J, Thayumanavan S. Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(9):836-851.
10. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*. 1986;46(12 I):6387-6392.
11. Mailänder V, Landfester K. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*. 2009;10(9):2379-2400.
12. Zhang LW, Monteiro-Riviere NA. Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *Toxicological Sciences*. 2009;110(1):138-155.
13. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. 2010;145(3):182-195.
14. Douglas KL, Piccirillo CA, Tabrizian M. Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;68(3):676-687.
15. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;66(17):2873-2896.

16. Kumari S, Mg S, Mayor S. Endocytosis unplugged: Multiple ways to enter the cell. *Cell Research*. 2010;20(3):256-275.
17. Nam HY, Kwon SM, Chung H, Lee SY, Kwon SH, Jeon H, Kim Y, Park JH, Kim J, Her S, Oh YK, Kwon IC, Kim K, Jeong SY. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2009;135(3):259-267.
18. Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Implications for drug and gene delivery. 2002;16(10):1217-1226.
19. Tahara K, Sakai T, Yamamoto H, Takeuchi H, Hirashima N, Kawashima Y. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;382(1-2):198-204.
20. Wang ZH, Wang ZY, Sun CS, Wang CY, Jiang TY, Wang SL. Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Biomaterials*. 2010;31(5):908-915.
21. Sultana Y, Maurya DP, Iqbal Z, Aqil M. Nanotechnology in ocular delivery: Current and future directions. *Drugs of Today*. 2011;47(6):441-455.
22. Patlolla RR, Chougule M, Patel AR, Jackson T, Tata PNV, Singh M. Formulation, characterization and pulmonary deposition of nebulized celecoxib encapsulated nanostructured lipid carriers. *Journal of Controlled Release*. 2010;144(2):233-241.
23. Pan Y, Li YJ, Zhao HY, Zheng JM, Xu H, Wei G, Hao JS, Cui FD. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: Chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;249(1-2):139-147.
24. Slütter B, Bal S, Keijzer C, Mallants R, Hagenaars N, Que I, Kaijzel E, van Eden W, Augustijns P, Löwik C, Bouwstra J, Broere F, Jiskoot W. Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: Nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. *Vaccine*. 2010;28(38):6282-6291.
25. Lee PW, Hsu SH, Tsai JS, Chen FR, Huang PJ, Ke CJ, Liao ZX, Hsiao CW, Lin HJ, Sung HW. Multifunctional core-shell polymeric nanoparticles for transdermal DNA delivery and epidermal Langerhans cells tracking. *Biomaterials*. 2010;31(8):2425-2434.
26. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;14(2):101-114.
27. Shah PP, Desai PR, Patel AR, Singh MS. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. *Biomaterials*. 2012;33(5):1607-1617.
28. Rancan F, Papakostas D, Hadam S, Hackbarth S, Delair T, Primard C, Verrier B, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Investigation of polylactic acid (PLA) nanoparticles as drug delivery systems for local dermatotherapy. *Pharmaceutical Research*. 2009;26(8):2027-2036.
29. Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, Weiß B, Schaefer UF, Lehr CM, Wepf R, Sterry W. Nanoparticles - An efficient carrier for

- drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;66(2):159-164.
30. Alvarez-Román R, Barré G, Guya RH, Fessi H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2001;52(2):191-195.
 31. Colonna C, Conti B, Perugini P, Pavanetto F, Modena T, Dorati R, Iadarola P, Genta I. Ex vivo evaluation of prolidase loaded chitosan nanoparticles for the enzyme replacement therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70(1):58-65.
 32. Domb AJ, Kost J, Wiseman DM. *Handbook of biodegradable polymers*: Harwood Academic Publishers; 1997.
 33. Franz G. Polysaccharides in pharmacy. *Advances in Polymer Science*. 1986;76:1-30.
 34. Elmowafy E, Awad G, Mansour S, El-Shamy A. Release Mechanisms Behind Polysaccharides-Based Famotidine Controlled Release Matrix Tablets. 2008;9(4):1230-1239.
 35. Pal K, Banthia AK, Majumdar DK. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. 2007;8(1):21. Epub 2007/04/06.
 36. Madhumathi K, Shalumon KT, Rani VV, Tamura H, Furuike T, Selvamurugan N, Nair SV, Jayakumar R. Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. 2009;45(1):12-15. Epub 2009/05/19.
 37. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. 2004;57(1):19-34. Epub 2004/01/20.
 38. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*. 2001;22(8):763-768. Epub 2001/03/15.
 39. Thakur G, Mitra A, Rousseau D, Basak A, Sarkar S, Pal K. Crosslinking of gelatin-based drug carriers by genipin induces changes in drug kinetic profiles in vitro. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 2011;22(1):115-123.
 40. Sanzgiri YD, Maschi S, Crescenzi V, Callegaro L, Topp EM, Stella VJ. Gellan-based systems for ophthalmic sustained delivery of methylprednisolone. *Journal of Controlled Release*. 1993;26(3):195-201.
 41. Miyazaki S, Kawasaki N, Kubo W, Endo K, Attwood D. Comparison of in situ gelling formulations for the oral delivery of cimetidine. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;220(1-2):161-168.
 42. Agnihotri SA, Jawalkar SS, Aminabhavi TM. Controlled release of cephalexin through gellan gum beads: Effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size, and drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;63(3):249-261.

43. Miyazaki S, Suisha F, Kawasaki N, Shirakawa M, Yamatoya K, Attwood D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 1998;56(1–3):75-83.
44. Suisha F, Kawasaki N, Miyazaki S, Shirakawa M, Yamatoya K, Sasaki M, Attwood D. Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mitomycin C. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998;172(1–2):27-32.
45. Kawasaki N, Ohkura R, Miyazaki S, Uno Y, Sugimoto S, Attwood D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999;181(2):227-234.
46. Nerurkar J, Jun HW, Price JC, Park MO. Controlled-release matrix tablets of ibuprofen using cellulose ethers and carrageenans: effect of formulation factors on dissolution rates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;61(1–2):56-68.
47. Caldorera-Moore M, Peppas NA. Micro- and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61(15):1391-1401.
48. Motornov M, Roiter Y, Tokarev I, Minko S. Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2010;35(1-2):174-211.
49. Daniel-da-Silva AL, Ferreira L, Gil AM, Trindade T. Synthesis and swelling behavior of temperature responsive κ -carrageenan nanogels. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011;355(2):512-517.
50. Daniel-Da-Silva AL, Fateixa S, Guiomar AJ, Costa BFO, Silva NJO, Trindade T, Goodfellow BJ, Gil AM. Biofunctionalized magnetic hydrogel nanospheres of magnetite and κ -carrageenan. *Nanotechnology*. 2009;20(35).
51. Campo VL, Kawano DF, Silva Jr DBd, Carvalho I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydrate Polymers*. 2009;77(2):167-180.
52. Catanzar.Pj, Schwartz HJ, Graham RC. Spectrum and Possible Mechanism of Carrageenan Cytotoxicity. *American Journal of Pathology*. 1971;64(2):387-&.
53. Cohen SM, Ito N. A critical review of the toxicological effects of carrageenan and Processed Eucheuma Seaweed on the gastrointestinal tract. *Critical Reviews in Toxicology*. 2002;32(5):413-444.
54. Thomson AW, Fowler EF. Carrageenan: a review of its effects on the immune system. *Inflammation Research*. 1981;11(3):265-273.
55. Phillips GO, Williams PA. Handbook of hydrocolloids. Boca Raton, FL: CRC Press; 2000. xxii, 450 p. p.
56. Weiner ML. Toxicological properties of carrageenan. *Agents and Actions*. 1991;32(1-2):46-51. Epub 1991/01/01.
57. Bhattacharyya S, Liu HY, Zhang ZQ, Jam M, Dudeja PK, Michel G, Linhardt RJ, Tobacman JK. Carrageenan-induced innate immune response is modified by

- enzymes that hydrolyze distinct galactosidic bonds. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2010;21(10):906-913.
58. Tobacman JK. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environmental Health Perspectives*. 2001;109(10):983-994.
59. Bhattacharyya S, Borthakur A, Dudeja PK, Tobacman JK. Carrageenan induces cell cycle arrest in human intestinal epithelial cells in vitro. *Journal of Nutrition*. 2008;138(3):469-475.
60. Weiner ML, Nuber D, Blakemore WR, Harriman JF, Cohen SM. A 90-day dietary study on kappa carrageenan with emphasis on the gastrointestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*. 2007;45(1):98-106. Epub 2006/10/13.
61. Ren SW, Li J, Wang W, Guan HS. Protective effects of κ -ca3000+CP against ultraviolet-induced damage in HaCaT and MEF cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2010;101(1):22-30.
62. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, Lowy DR, Schiller JT. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nature Medicine*. 2007;13(7):857-861.
63. Goldsmith LA. *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1991.
64. McGrath JA, Eady RAJ, Pope FM. *Anatomy and Organization of Human Skin*. Rook's Textbook of Dermatology: Blackwell Publishing, Inc.; 2008. p. 45-128.
65. Wiegand C, Hipler UC. Evaluation of Biocompatibility and Cytotoxicity Using Keratinocyte and Fibroblast Cultures. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2009;22(2):74-82.
66. Merten OW. Introduction to animal cell culture technology-past, present and future. *Cytotechnology*. 2006;50(1-3):1-7. Epub 2008/11/13.
67. Freshney RI. *Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell; 2010. xxxi, 732 p., 728 p. of plates p.
68. Sanford KK, Evans VJ. A Quest for the Mechanism of Spontaneous Malignant Transformation in Culture with Associated Advances in Culture Technology. *Journal of the National Cancer Institute*. 1982;68(6):895-913.
69. Sager R, Tanaka K, Lau CC, Ebina Y, Anisowicz A. Resistance of Human-Cells to Tumorigenesis Induced by Cloned Transforming Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. 1983;80(24):7601-7605.
70. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. 1988;106(3):761-771. Epub 1988/03/01.
71. Vandebriel RJ, Pennings JLA, Baken KA, Pronk TE, Boorsma A, Gottschalk R, Van Loveren H. Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. *Toxicological Sciences*. 2010;117(1):81-89.

72. Huang C-L, Shu W-Y, Tsai M-L, Chiang C-S, Chang C-W, Chang C-T, Hsu IC. Repeated Small Perturbation Approach Reveals Transcriptomic Steady States. 2011;6(12).
73. Lee KM, Lee JG, Seo EY, Lee WH, Nam YH, Yang JM, Kee SH, Seo YJ, Park JK, Kim CD, Lee JH. Analysis of genes responding to ultraviolet B irradiation of HaCaT keratinocytes using a cDNA microarray. *British Journal of Dermatology*. 2005;152(1):52-59.
74. Byung YK, Kim S, Lee KH, Yong SL, Hong I, Lee MO, Min D, Chang I, Jae SH, Jun SP, Duck HK, Kim BG. Transcriptional profiling in human HaCaT keratinocytes in response to kaempferol and identification of potential transcription factors for regulating differential gene expression. *Experimental and Molecular Medicine*. 2008;40(2):208-219.
75. Kim S, Kang BY, Cho SY, Sung DS, Chang HK, Yeom MH, Kim DH, Sim YC, Lee YS. Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronan in hairless mouse skin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;316(2):348-355.
76. Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999;112(3):343-353.
77. Altenburger R, Kissel T. The human keratinocyte cell line HaCaT: An in vitro cell culture model for keratinocyte testosterone metabolism. *Pharmaceutical Research*. 1999;16(5):766-771.
78. Ormerod MG. Flow cytometry : a practical approach. 3rd ed. Oxford England ; New York: Oxford University Press; 2000. xx, 276 p. p.
79. Coder DM. Assessment of Cell Viability. *Current Protocols in Cytometry*: John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
80. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Wagner M, Kohler H, Van Kooten TG, Klein CL, Otto M. Current trends in biocompatibility testing. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 1998;212(2):75-84.
81. Silva GA, Costa FJ, Coutinho OP, Radin S, Ducheyne P, Reis RL. Synthesis and evaluation of novel bioactive composite starch/bioactive glass microparticles. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2004;70(3):442-449.
82. O'Connor JE, Callaghan RC, Escudero M, Herrera G, Martínez A, Monteiro MDC, Montoílu H. The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. 2001;51(4):231-239.
83. Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. Flow cytometry in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001;56(3-4):350-360.
84. Silva T, Reis A, Hewitt C, Roseiro J. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*. 2004;77:32-40.
85. Guttenbach M, Schmid M. Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures. *Experimental Cell Research*. 1994;211(1):127-132.

86. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2000;455(1-2):81-95.
87. Dellarco VL, Mavournin KH, Tice RR. Aneuploidy and health risk assessment: Current status and future directions. *Environmental Mutagenesis*. 1985;7(3):405-424.
88. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research*. 1975;31(1):9-15.
89. Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1973;18(2):187-190.
90. Fenech M, Morley A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*. 1985;43(172-173):233-246.
91. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*. 1985;147(1-2):29-36.
92. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*. 1986;161(2):193-198.
93. Atencia R, García-Sanz M, Pérez-Yarza G, Asumendi A, Hilario E, Aréchaga J. A structural analysis of cytoskeleton components during the execution phase of apoptosis. *Protoplasma*. 1997;198(3-4):163-169.
94. Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: Description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*. 1999;14(6):605-612.
95. Daniel-da-Silva AL, Trindade T, Goodfellow BJ, Costa BFO, Correia RN, Gil AM. In situ synthesis of magnetite nanoparticles in carrageenan gels. *Biomacromolecules*. 2007;8(8):2350-2357.
96. Crane M, Handy RD, Garrod J, Owen R. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*. 2008;17(5):421-437.
97. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
98. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*. 1987;56(3):279-285.
99. Eastmond DA, Tucker JD. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1989;13(1):34-43.
100. Carvalho V, Castanheira P, Madureira P, Ferreira SA, Costa C, Teixeira JP, Faro C, Vilanova M, Gama M. Self-assembled dextrin nanogel as protein carrier: Controlled release and biological activity of IL-10. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011;108(8):1977-1986.

101. Song MM, Bi H, Zhang Y. Fabrication of Fe@mSiO₂ nanowires with large remanence and low cytotoxicity for targeted drug delivery. *Journal of Applied Physics*. 2012;111(7).
102. Morito A, Fujisawa K, Eguchi T, Ota Y. Protective effects of polysaccharides and polyhydric alcohols in a dry mouth model in cultured cells. *Supportive Care in Cancer*. 2012;20(4):725-731.
103. Wilcox DK, Higgins J, Bertram TA. Colonic epithelial cell proliferation in a rat model of nongenotoxin- induced colonic neoplasia. *Laboratory Investigation*. 1992;67(3):405-411.
104. Glauert HP, Bennik MR. Influence of diet or intrarectal bile acid injections on colon epithelial cell proliferation in rats previously injected with 1,2-dimethylhydrazine. *Journal of Nutrition*. 1983;113(3):475-482.
105. Corpet DE, Taché S, Préclaire M. Carrageenan given as a jelly, does not initiate, but promotes the growth of aberrant crypt foci in the rat colon. *Cancer Letters*. 1997;114(1-2):53-55.
106. Tache S, Peiffer G, Millet AS, Corpet DE. Carrageenan gel and aberrant crypt foci in the colon of conventional and human flora-associated rats. *Nutrition and Cancer*. 2000;37(2):193-198.
107. Wang CH, Chang CW, Peng CA. Gold nanorod stabilized by thiolated chitosan as photothermal absorber for cancer cell treatment. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011;13(7):2749-2758.
108. Matteini P, Ratto F, Rossi F, Centi S, Dei L, Pini R. Chitosan films doped with gold nanorods as laser-activatable hybrid bioadhesives. *Advanced Materials*. 2010;22(38):4313-4316.
109. Lai W-W, Hsiao Y-P, Chung J-G, Wei Y-H, Cheng Y-W, Yang J-H. Synergistic phototoxic effects of glycolic acid in a human keratinocyte cell line (HaCaT). *Journal of Dermatological Science*. 2011;64(3):191-198.
110. Huang H-S, Liu Z-M, Hong D-Y. Blockage of JNK pathway enhances arsenic trioxide-induced apoptosis in human keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;244(2):234-241.
111. Hsiao Y-P, Huang H-L, Lai W-W, Chung J-G, Yang J-H. Antiproliferative effects of lactic acid via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in a human keratinocyte cell line (HaCaT). *Journal of Dermatological Science*. 2009;54(3):175-184.
112. Hintzsche H, Riese T, Stopper H. Hyperthermia-induced micronucleus formation in a human keratinocyte cell line. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2012;738–739(0):71-74.
113. Jaeger A, Weiss DG, Jonas L, Kriehuber R. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology*. 2012;296(1–3):27-36.